

Aus der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik
Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie an der
Universität Tübingen

**Bildbasierte Analyse der Ultrastruktur des humanen
Kniegelenk-Knorpels mittels Synchrotron-Radiation- μ CT**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Beutler, Kevin Ralf

2021

Dekan: Professor Dr. B. Pichler
1. Berichterstatter: Professor Dr. U. K. Hofmann
2. Berichterstatter: Professor Dr. S. Gatidis

Tag der Disputation: 01.12.2021

Meinen Eltern

Sprachliche Gleichstellung

Aus Gründen der besseren Lesbarkeit wird auf die gleichzeitige Verwendung männlicher und weiblicher Sprachformen verzichtet. Sämtliche Personenbezeichnungen gelten gleichwohl für beiderlei Geschlecht.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IX
Tabellenverzeichnis	XV
Abkürzungsverzeichnis	XVI
1 Einleitung	19
1.1 Der Kniegelenk-Knorpel: Physiologie, Pathophysiologie und manifeste Arthrose	19
1.1.1 Entwicklung, Aufbau und Funktion	19
1.1.1.1 Chondrozyten	20
1.1.1.2 Extrazellulärmatrix	20
1.1.1.3 Zusammenwirken der Chondrozyten und der EZM	21
1.1.2 Degeneration	22
1.1.2.1 Pathophysiologie der Knorpeldegeneration	22
1.1.3 Osteoarthrose	23
1.1.3.1 Definition & Epidemiologie	23
1.1.3.2 Klinik & Diagnostik	23
1.1.3.3 Therapie und Prophylaxe	24
1.2 Motivation und Zielsetzung	26
1.2.1 Vorangehende Forschungen	26
1.2.1.1 Histologische Vorarbeit	26
1.2.1.2 Synchrotron-Radiation-Mikro-Computertomografie	29
1.2.2 Definition der Studienziele	31
2 Material und Methoden	32
2.1 Material	32
2.1.1 Geräte	32
2.1.2 Gebrauchsartikel	33
2.1.3 Chemikalien	34
2.1.4 Software	36
2.1.5 Sonstige Materiale	37
2.2 Methoden	38
2.2.1 Studiendesign	38

2.2.1.1	Genehmigung der Studie	38
2.2.1.2	Aufklärung und Einwilligung der Studienteilnehmer	38
2.2.1.3	Erhebung personenbezogener Informationen.....	38
2.2.1.4	Ablauf der Studie	38
2.2.2	Gewebebegewinnung.....	40
2.2.3	Lagerung	41
2.2.4	Makroskopische Evaluation.....	41
2.2.4.1	Extrahierung der Proben.....	45
2.2.4.2	Chemische Fixierung	46
2.2.4.3	Chemische Dekalzifizierung.....	47
2.2.5	Mikroskopische Evaluation	48
2.2.5.1	Dünnschnittgewinnung.....	48
2.2.5.2	Färbung mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol	50
2.2.5.3	Anfertigung der Aufnahmen	51
2.2.5.4	Vorläufige zweidimensionale qualitative Analyse.....	54
2.2.6	Morphologische Grobadjustierung	55
2.2.7	Färbung mit Kontrastmittel	56
2.2.8	Dehydratisierung	57
2.2.8.1	Alkoholische Dehydratisierung.....	58
2.2.8.2	Lyophilisation	64
2.2.9	Morphologische Feinadjustierung	65
2.2.10	Anfertigung der SR- μ CT-Aufnahmen	66
2.2.10.1	Beladung der Stempel	66
2.2.10.2	Positionierung und Ausrichtung der Stempel	70
2.2.10.3	Programmierung des Computertomografen.....	71
2.2.10.4	Durchführung der Messungen	72
2.2.11	Aufbereitung der μ CT-Rohdaten	73
2.2.11.1	Konvertierung der Schnittbilder.....	73
2.2.11.2	Reduktion der Datensatzgröße	74
2.2.11.3	Import und Vorbereitung der Datensätze	74
2.2.12	Mikroskopische Reevaluation	76
2.2.12.1	Rehydratisierung.....	76

2.2.12.2	Dünnschnittgewinnung.....	77
2.2.12.3	Morphologische Adjustierung.....	77
2.2.12.4	Färbung mit 4'6-Diamidin-2-phenylindol	77
2.2.12.4.1	Färbung der Dünnschnitte.....	78
2.2.12.4.2	En-bloc-Färbung der rehydratisierten Proben	78
2.2.12.5	Anfertigung der Aufnahmen	78
2.2.12.5.1	Mosaikanfertigung von Reservedünnschnitten.....	78
2.2.12.5.2	Mosaikanfertigung neuer Dünnschnitte	79
2.2.12.5.3	Mosaikanfertigung der apikalen Probenschicht.....	79
2.2.12.6	Aufbereitung der Aufnahmen	79
2.2.12.6.1	Konvertierung der Aufnahmen.....	80
2.2.12.7	Zweidimensionale qualitative Analyse	80
2.2.12.7.1	Vergleich Reserve- und neuer Dünnschnitte.....	80
2.2.12.7.2	Vergleich neuer Dünnschnitte mit aktueller Studienlage	
	80	
2.2.12.8	Zweidimensionale quantitative Analyse	81
2.2.13	Dreidimensionale qualitative Analyse	82
2.2.13.1	Segmentation der Datensätze	82
2.2.13.2	Konvertierung und Export der Datensätze	85
2.2.13.3	Erstellung digitaler Veröffentlichungen.....	85
2.2.14	Dreidimensionale quantitative Analyse	86
2.2.15	Verfassen der Dissertationsschrift	86
3	Ergebnisse.....	87
3.1	Studienpopulation.....	87
3.2	Zweidimensionale qualitative Analyse	87
3.2.1	Vergleich der Dünnschnitte vor und nach De-/Rehydratisierung.	87
3.2.2	Auswertung in Top-Down- und Seitansicht	87
3.2.2.1	Deskriptive Analyse	91
3.2.2.2	Interpretation.....	93
3.3	Zweidimensionale quantitative Analyse	95
3.4	Dreidimensionale qualitative Analyse	98
3.4.1	Auswertung vorläufiger Aufnahmen	98

3.4.2	Auswertung definitiver Aufnahmen.....	99
3.4.2.1	Segmentation der SCSO	101
3.5	Dreidimensionale quantitative Analyse	107
4	Diskussion	108
4.1	Qualitative Erkenntnisse	108
4.2	Zelluläres Remodelling	109
4.2.1	Bestätigung der SCSO	109
4.2.2	Ursachen der zellulären Umstrukturierung	111
4.2.3	Ursachen und Folgen der veränderten Zellkonzentration.....	114
4.3	Ausblick	117
4.4	Limitationen	118
5	Zusammenfassung	122
6	Literaturverzeichnis.....	123
7	Erklärung zum Eigenanteil	133
8	Veröffentlichungen	135
9	Danksagung.....	136

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Probe in der μ CT.	42
Abbildung 2: Übersicht der bei operativer Implantation von Totalendoprothesen anfallenden Femurkondylenresektate. A+B: Distales Femurkondylenresektat C+D+E: Vier-in-Eins-Schablonenresektat.	44
Abbildung 3: Unbearbeitete Probe nach Extrahierung aus dem Femurkondylenresektat.	46
Abbildung 4: Unbeladener Kryostatstempel (A), Kryostatstempel mit Probe (B) und in Medium eingebettete Probe (C).	49
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Rasterung und Fokusdefinierung eines Gewebedünnschnitts mittels AxioVision.	52
Abbildung 6: Fluoreszierende Übersichtsaufnahme (Col6a3+FITC, Kollagen VI = weiß) mit 5%iger Überlappung (A), 15%iger Überlappung (B) und 20%iger Überlappung (C).	53
Abbildung 7: Fluoreszierende Übersichtsaufnahme (Col6a3+FITC, Kollagen VI = weiß) eines Probendünnschnitts (A) mit vergrößerten Ausschnitten zur Zelldifferenzierung (B+C).	54
Abbildung 8: Fluoreszierende Übersichtsaufnahme (DAPI, Nuclei = blau) desselben Dünnschnitts aus Abbildung 7 (A) mit vergrößerten Ausschnitten zur Zelldifferenzierung (B+C).	54
Abbildung 9: Beispiel einer Probe mit bogenförmiger Krümmung um eine Achse. Knorpel = konvexe Fläche, subchondraler Knochen = konkave Fläche.	59
Abbildung 10: Schienungsapparatur für den Dehydratisierungsprozess, bestehend aus zwei Hartplastikplatten (rechteckige, durchsichtige Boden- und Deckplatten), die von je zwei Haargummis (schwarz, vertikal verlaufend) zusammengehalten werden mit dazwischen eingespannter Probe (gelblich) in Seitansicht (A) und Apikalsicht (B).	60
Abbildung 11: Bildfolge zur Darstellung der Problematik und Lösungsfindung bei der korrekten Positionierung der Probe in der Schienungsapparatur.	62

Abbildung 12: Proben im Dehydratisierungsprozess in einer Zellkulturplatte (6-Well); Teilweise unter Verwendung der vorherig beschriebenen Pipetten-Filterspitzen (rote Markierung).....	62
Abbildung 13: Probe (gelblich) auf einem Objektträger liegend nach dem Dehydratisierungsprozess unter Verwendung einer Schienungsapparatur.....	63
Abbildung 14: Dehydratisierte Probe mit paradoxem Krümmungseffekt entgegen der ursprünglichen Krümmungsrichtung. Knorpel = konkave Fläche, subchondraler Knochen = konvexe Fläche.	64
Abbildung 15: Probe nach Dehydratisierung mittels Vakuum-Konzentrationszentrifuge mit morphologischen Torsionen um zwei Achsen....	65
Abbildung 16: Unbeladener μ CT-Stempel.....	66
Abbildung 17: Beispiel eines mit in dem Trinkhalm mit der Knorpelprobe beladenen μ CT-Stempels (A) sowie dessen optimale Lagerung in einer dafür vorgesehenen Halterung (B).	70
Abbildung 18: Fluoreszierende Apikalaufnahme (DAPI, Nuclei = weiß) einer Probe ^[63] . Zu erkennen sind deutlich die in der Probenmitte lokalisierten Clusterformationen als Korrelat der tiefreichenden Knorpelläsion.....	79
Abbildung 19: Fluoreszierende zweidimensionale Mehrperspektiven-Aufnahme (DAPI, Nuclei = weiß) der Probe #1 aus der Top-Down-Ansicht (A) sowie der Seitansicht (B+C) ^[63] . In der zweiten Seitansicht (C) wurden die Zonen mit dem jeweils prädominanten SCSO segmentiert und farblich codiert hervorgehoben. Zur besseren Veranschaulichung wurden die Probenkrümmungen durch vertikale Gewebeeinschnitte begradigt (schwarze Dreiecke in B+C, nach apikal spitz zulaufend). In der Top-Down-Ansicht (A) scharfer Übergang einer homogenen Zellverteilung, häufig in Einzelstringformation und ohne fokale Konzentrationen von Fluoreszenzsignalen im linken Probendrittel zu einer Ansammlung rundlicher Zellgruppierungen mit verstärkter Fluoreszenz. Auffallend groß und hell leuchtend erscheinen die Gruppierungen im mittleren Probendrittel. In der Seitansicht (B) scharfer Übergang der Morphologie von reichlicher Probensubstanz mit homogenem apikalen Relief im linken Probendrittel zu einem ausgeprägten Substanzverlust mit deutlich aufgerautem apikalen Relief mit tiefgreifenden Fissuren. In der zweiten Seitansicht (C)	

scharfer Übergang der räumlichen Zellorientierung und -konzentration. Im linken Drittel bildet die oberste Schicht ein Areal mit tangential zur Knorpeloberfläche verlaufenden, überwiegend zu Einzelstrings formierten Zellen in hoher Konzentration (blau). Basal davon sind die Zellen überwiegend als arkadenförmige Einzelstrings (grün) und teilweise Doppelstrings (gelb) formiert. In den rechten beiden Dritteln fehlen die Zellen im Bereich des Substanzdefekts vollständig. Zwischen den tiefen, zellfreien Fissuren sind räumliche, große Zellgruppierungen mit hoher Fluoreszenzsignalkonzentration zu erkennen (rot), unmittelbar basal davon präsentieren sich Regionen kleinerer Zellgruppierungen (orange). In der basalen Knorpelzone vor dem subchondralen Knochen sind Einzel- und Doppelstrings zu finden. 88

Abbildung 20: Fluoreszierende zweidimensionale Mehrperspektiven-Aufnahme (DAPI, Nuclei = weiß) der Probe #2 aus der Top-Down-Ansicht (A) sowie der Seitansicht (B+C)^[66]. In der zweiten Seitansicht (C) wurden die Zonen mit dem jeweils prädominanten SCSO segmentiert und farblich codiert hervorgehoben. Zur besseren Veranschaulichung wurden die Probenkrümmungen durch vertikale Gewebeseinschnitte begradigt (schwarze Dreiecke in A+B+C, nach apikal spitz zulaufend). In der Top-Down-Ansicht (A) scharfer Übergang einer homogenen Zellverteilung, häufig in Einzelstringformation und ohne fokale Konzentrationen von Fluoreszenzsignalen im linken Probendrittel zu einer Ansammlung rundlicher Zellgruppierungen mit verstärkter Fluoreszenz. Auffällig ist eine fleckige Aufhellung singulär und fokal im linken Drittel der Probe. In der Seitansicht (B) scharfer Übergang der Morphologie von reichlicher Probensubstanz mit homogenem apikalen Relief im linken Probendrittel zu einem ausgeprägten Substanzverlust mit deutlich aufgerautem apikalen Relief mit tiefgreifenden Fissuren. In der zweiten Seitansicht (C) scharfer Übergang der räumlichen Zellorientierung und -konzentration. Im linken Drittel bildet die oberste Schicht ein Areal mit tangential zur Knorpeloberfläche verlaufenden, überwiegend zu Einzelstrings formierten Zellen in hoher Konzentration (blau). Basal davon sind die Zellen überwiegend als arkadenförmige Einzelstrings (grün) und teilweise Doppelstrings (gelb) formiert. In den rechten beiden Dritteln fehlen die Zellen im Bereich des Substanzdefekts vollständig. Zwischen den

tiefen, zellfreien Fissuren sind große räumliche Zellgruppierungen mit hoher Fluoreszenzsignalkonzentration zu erkennen (rot), unmittelbar basal davon präsentieren sich Regionen kleinerer Zellgruppierungen (orange). In der basalen Knorpelzone vor dem subchondralen Knochen sind Einzel- und vor allem Doppelstrings zu finden. 89

Abbildung 21: Fluoreszierende zweidimensionale Mehrperspektiven-Aufnahme (DAPI, Nuclei = weiß) der Probe #3 aus der Top-Down-Ansicht (A) sowie der Seitansicht (B+C)^[67]. In der zweiten Seitansicht (C) wurden die Zonen mit dem jeweils prädominanten SCSO segmentiert und farblich codiert hervorgehoben. Zur besseren Veranschaulichung wurden die Probenkrümmungen durch vertikale Gewebeseinschnitte begradigt (schwarze Dreiecke in B+C, nach apikal spitz zulaufend). In der Top-Down-Ansicht (A) beinahe flächendeckende homogene Zellverteilung, häufig in Einzelstringformation und ohne fokale Konzentrationen von Fluoreszenzsignalen. In einem kleinen Areal im von links gesehen dritten Viertel der Probe lassen sich diffuse, aber lokal konzentrierte Fluoreszenzsignale feststellen. Auffällig sind fleckige Aufhellungen multifokal im linken Drittel sowie als breiter Streifen im rechten Drittel der Probe. In der Seitansicht (B) beinahe flächendeckend einheitliche Morphologie mit reichlicher Probensubstanz und homogenem Relief. Fokal im von links gesehen dritten Viertel der Probe ist ein kleiner Substanzdefekt mit einer Reliefunregelmäßigkeit zu erkennen. In der zweiten Seitansicht (C) weitgehend einheitliche Zellorientierung und -konzentration, die oberste Schicht bildet ein Areal mit tangential zur Knorpeloberfläche verlaufenden, überwiegend zu Einzelstrings formierten Zellen in hoher Konzentration (blau). Basal davon sind die Zellen als arkadenförmige Einzelstrings (grün) Doppelstrings (gelb) formiert. Im von links gesehen dritten Viertel der Probe fehlt die blaue Zone ohne nennenswerten Substanzdefekt. Stattdessen sind große räumliche Zellgruppierungen mit hoher Fluoreszenzsignalkonzentration weit apikal lokalisiert zu erkennen (rot). Konzentrisch darum orientiert und U-förmig links und rechts davon an die apikale Probenoberfläche reichend sind räumliche Zellgruppierungen von geringerer Größe zu erkennen (orange). Dazwischenliegend und der roten Zone quasi plombenförmig apikal aufliegend ist eine Zone hoher

Zellkonzentration ohne erkennbare strukturelle Formation zu erkennen (violett). Die basale Zone innerhalb dieses Probenviertels bilden vorwiegend Doppelstrings (gelb).	90
Abbildung 22: Fluoreszierende Seitansicht-Aufnahmen (DAPI, Nuclei = weiß) der Proben #1–3 (A–C) ^[68] . Auf den Proben abgebildet sind jeweils 3 Auszählareale pro definierter SCSO-Zone zur quantitativen 2D-Auswertung. Die Proben weisen ihre natürliche Krümmung auf; In Probe #1 ist der Knorpel oben und der subchondrale Knochen unten lokalisiert (A), während in den Proben #2 und #3 der subchondrale Knochen oben und der Knorpel unten lokalisiert ist (B+C).....	96
Abbildung 23: Zelldichten aufgeschlüsselt nach der zellulären Organisation: SZ = Superficialzone, SS = Single-Strings-Zone, DS = Double-Strings-Zone, SC = Small-Clusters-Zone, LC = Large-Clusters-Zone ^[69] . Die zugrundeliegenden Daten sind den entsprechenden Tabellen zu entnehmen (Zelldichten: Tabelle 11; p-Werte: Tabelle 12). Die Lokalisation der entsprechenden SCSO-Zonen ist in Abbildung 19C, Abbildung 20C und Abbildung 21C visualisiert. Signifikante Unterschiede sind mit einem Sternchen (*) versehen.	97
Abbildung 24: Seitansicht (A) sowie Querschnittsansicht (B) (y/z-Ebene) der dreidimensional rekonstruierten Aufnahme von Probe #2 ^[71] . Die orangene Linie in (A) markiert die Schnittebene. Die Seitansicht (A) demonstriert den zusammengesetzten, vollständigen Datensatz bestehend aus mehreren Tausend Einzelbildern. Ein beispielhaftes Einzelbild ist in der Querschnittsansicht (B) zu erkennen. In der Mitte dieser Querschnittsansicht ist das Drehzentrum der Probe in der μ CT zu erkennen, von welchem aus sich konzentrische Kreisartefakte über die gesamte Abbildung ausdehnen. Weiterhin sind basal links und rechts im Bild Anteile des Trinkhalms abgebildet, der als Einbettungsmedium diente und zur Schonung der Probe nicht vollständig extrahiert werden konnte.....	100
Abbildung 25: Identifikation individueller SCSO in Probe #1 ^[72] . Seitansicht nativ (A); Seitansicht mit Hervorhebung segmentierter Muster (B); Großansicht der segmentierten Muster mit farblicher Codierung (C1–4, keine einheitliche Skalierung): cyan-transparent: Matrixlakunen, violett: Nuclei.....	101

Abbildung 26: Identifikation individueller SCSO in Probe #2 ^[73] . Seitansicht nativ (A); Seitansicht mit Hervorhebung segmentierter Muster (B); Großansicht der segmentierten Muster mit farblicher Codierung (C1–4, keine einheitliche Skalierung): cyan-transparent: Matrixlakunen, violett: Nuclei.	102
Abbildung 27: Identifikation individueller SCSO in Probe #3. Seitansicht nativ (A); Seitansicht mit Hervorhebung segmentierter Muster (B); Großansicht der segmentierten Muster mit farblicher Codierung (C1–4, keine einheitliche Skalierung): cyan-transparent: Matrixlakunen, violett: Nuclei.	103
Abbildung 28: Übersicht eines segmentierten Vertreters je SCSO ^[74] . Spalte 1 demonstriert die Nuclei (violett), Spalte 2 die Matrices (cyan) und Spalte 3 eine Kombination aus Nuclei (violett) und Matrices (cyan-transparent). Spalte 4 zeigt Standaufnahmen eines interaktiven 3D-Modells, wie es in der digitalen Version als PDF-Datei vorhanden ist und interaktiv betrachtet werden kann. Wie zu erkennen ist, wurde zur Segmentation der diffusen Zelldistribution eine kubische Form aus der Probe #3 in der entsprechenden Zone markiert und in toto in die entsprechenden Labels gespeichert (F1–4).....	104
Abbildung 29: Segmentation kompletter Musterzonen en bloc (Matrix = cyan-transparent, Nuclei = violett) ^[75] . Physiologischer Knorpel (A), Double-Strings-Zone (B), Small-Clusters-Zone (C) und Large-Clusters-Zone (D).	105
Abbildung 30: Segmentation kompletter Musterzonen en bloc (Nuclei = violett) ^[75] . Physiologischer Knorpel (A), Double-Strings-Zone (B), Small-Clusters-Zone (C) und Large-Clusters-Zone (D).	106
Abbildung 31: Standaufnahmen der vollständigen en-Bloc-Segmentation der Proben #1 (A) und #3 (B) zur Visualisierung des dreidimensionalen Zusammenhangs der SCSO-Zonen analog der zweidimensionalen SCSO-Zonen-Segmentation in Abbildung 19C und Abbildung 21C ^[63,67] . Superficialzone = blau, Single-Strings-Zone = grün, Double-Strings-Zone = gelb, Small-Clusters-Zone = orange, Large-Clusters-Zone = rot, Diffuse-Distribution-Zone = violett (B). Zur Hervorhebung der dreidimensionalen Ausdehnung der SCSO-Zonen wurden die Proben um die x-Achse in Richtung Betrachter gekippt.	107

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der in den Experimenten verwendeten Geräte.....	32
Tabelle 2: Auflistung der in den Experimenten verwendeten Gebrauchsartikel	33
Tabelle 3: Auflistung der in den Experimenten verwendeten Chemikalien	34
Tabelle 4: Auflistung der in den Experimenten verwendeten Software	36
Tabelle 5: Auflistung der in den Experimenten verwendeten sonstigen Materiale	37
Tabelle 6: Maximalmaße der Proben in der μ CT.....	43
Tabelle 7: Kalkulierte Maximalmaße der Proben bei Extrahierung aus den Kondylenresektaten.....	43
Tabelle 8: Auflistung der Kriterien für die mikroskopische Probenevaluation ...	55
Tabelle 9: Farbcodierung einzelner SCSO-Zonen.....	81
Tabelle 10: Farbcodierung einzelner Labels	84
Tabelle 11: Zelldichten der definierten SCSO-Zonen	97
Tabelle 12: Vergleich der Zelldichten und alpha-Fehler-Korrektur durch Verwendung der Falscherkennungsrate (FDR); Signifikante p-Werte sind fett gedruckt ^[70]	98

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent, Prozente
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µm ²	Quadrat-Mikrometer
2D	zweidimensional, zwei Dimensionen
3D	dreidimensional, drei Dimensionen
ACT	Autologe Chondrozytentransplantation
BG Klinik	Berufsgenossenschaftliche Unfallklinik
CT	Computertomografie
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DCM	Double Crystal Monochromator
DD	Diffuse-Distribution-Zone
dd H ₂ O	Wasser, bidestilliert
DESY	Deutsches Elektronen-Synchrotron
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMM	Double Multilayer Monochromator
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
DS	Double-Strings-Zone
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
EZM	Extrazelluläre Matrix
FBP	Filtered Back-Projection
FDR	False Discovery Rate
FGF-2	basic Fibroblast Growth Factor, Fibroblast Growth Factor 2
GB	Gigabyte
h	Stunde, Stunden
HDD	Hard Disk Drive
HEP	Hemiendoprothese
IL	Interleukin

JPEG	<i>Joint Photographic Experts Group</i>
KB	<i>Kilobyte</i>
keV	<i>Kiloelektronenvolt</i>
LC	<i>Large-Clusters-Zone</i>
mg	<i>Milligramm</i>
min	<i>Minute, Minuten</i>
miRNA	<i>micro-Ribonucleic Acid, mikro-Ribonukleinsäure</i>
ml	<i>Milliliter</i>
mm	<i>Millimeter</i>
MMP	<i>Matrix-Metalloproteinase</i>
mRNA	<i>messenger-Ribonucleic Acid, messenger-Ribonukleinsäure</i>
MRT	<i>Magnetresonanztomografie</i>
ms	<i>Millisekunde, Millisekunden</i>
NaOH	<i>Natriumhydroxid</i>
nm	<i>Nanometer</i>
NSAR	<i>nicht-steroidale Antirheumatika</i>
OA	<i>Osteoarthrose</i>
OBJ	<i>3D Object Format</i>
PCNA	<i>Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen</i>
pDD	<i>pattern Diffuse Distribution</i>
PDF	<i>Portable Document Format</i>
pDS	<i>pattern Double Strings</i>
PFA	<i>Paraformaldehyd</i>
pLC	<i>pattern Large Clusters</i>
pSC	<i>pattern Small Clusters</i>
pSS	<i>pattern Single Strings</i>
PZM	<i>Perizellulärmatrix</i>
SC	<i>Small-Clusters-Zone</i>
SCSO	<i>Superficial Chondrocyte Spatial Organisation</i>
SDD	<i>Sample-Detector-Distance</i>
SHG	<i>Second Harmonic Generation</i>
SLI	<i>Spectral Library</i>

SR- μ CT	<i>Synchrotron-Radiation-Mikro-Computertomografie</i>
SS	<i>Single-Strings-Zone</i>
SZ.....	<i>Superfizialzone</i>
TB.....	<i>Terabyte</i>
TEP	<i>Totalendoprothese</i>
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor beta</i>
TIF	<i>Tagged Image File</i>
TIFF.....	<i>Tagged Image File Format</i>
TNF	<i>Tumornekrosefaktor</i>
U3D	<i>Universal 3D Format</i>
UV-Strahlung.....	<i>Ultraviolette Strahlung</i>
ZVI.....	<i>Zeiss Vision Image</i>

1 Einleitung

1.1 Der Kniegelenk-Knorpel: Physiologie, Pathophysiologie und manifeste Arthrose

Der Gelenkknorpel ist das hochspezialisierte Verbundgewebe, welches die innere Oberfläche diarthrotischer Gelenke auskleidet. Er besteht aus spärlich verteilten Chondrozyten, eingebettet in eine sich großflächig ausdehnende Extrazellulärmatrix (EZM)^[1]. Seine Hauptfunktion ist die Gewährleistung des reibungsarmen Gleitens der artikulierenden Gelenkoberflächen. Er erfüllt hierbei eine Pufferfunktion zur gleichmäßigen Verteilung von Druck- und Scherkräften auf die Gelenkoberfläche, zu dessen Erfüllung der Knorpel eine einzigartige Morphologie aufweist.

In der Gruppe der hyalinen Knorpel nimmt der Gelenkknorpel eine Sonderrolle ein, da er kein Perichondrium besitzt^[2]. Durch das Fehlen dieser Knorpelhaut kann der Gelenkknorpel hierüber nicht regeneriert und ernährt werden und da er wie alle Knorpeltypen keine Gefäßversorgung aufweist^[2], erfolgt dessen Nährstoffversorgung allein über die Gelenkflüssigkeit, die sogenannte Synovia, von wo aus die Ernährung der Chondrozyten über teilweise mehrere Millimeter (mm) lange Diffusionsstrecken gelingen muss^[2]. Ein suffizientes Zusammenspiel der Chondrozyten mit deren Umgebung ist daher essentiell, um den hohen Anforderungen des Knorpels gerecht werden zu können. Strukturelle Schädigungen wiegen umso schwerer, da keine ausreichenden regenerativen Möglichkeiten existieren.

Mit fortschreitender Abnutzung des Gelenkknorpels verliert dieser die Fähigkeit der Erfüllung seiner biomechanischen Funktionalität, es entsteht das Krankheitsbild der manifesten Osteoarthrose (OA).

1.1.1 Entwicklung, Aufbau und Funktion

Chondroblasten, welche sich ihrerseits aus mesenchymalen Stammzellen entwickeln die in allen postnatalen Gewebetypen vorkommen, bilden die EZM und differenzieren sich zu Chondrozyten^[2,3]. Während der Entwicklung des Knorpels sind die Chondrozyten noch teilungsfähig und können daher proliferieren. Durch

eine Zunahme der EZM erfolgt die räumliche Verteilung der Chondrozyten. Dieses Zusammenspiel wird als interstitielles Wachstum bezeichnet und findet überwiegend in der frühen Phase der Knorpelbildung und des Knochenwachstums statt. Im Laufe des Reifungsprozesses des Gelenkknorpels verlieren die Chondrozyten das Potential zur Zellteilung.^[2]

1.1.1.1 Chondrozyten

Aufgrund des fehlenden Perichondriums sind es im adulten Gelenkknorpel die Chondrozyten allein^[4], die für die Homöostase dessen, ergo den Umsatz bzw. den Auf- und Abbau der EZM und somit für den Erhalt der Struktur und Funktionalität des Knorpels verantwortlich sind^[5]. Der Verlust dieser homöostatischen Balance ist wesentlich für die Entwicklung der OA^[6].

Reife Chondrozyten sind oval bis rund und beinhalten alle üblichen Zellorganellen sowie auffallend viele Glykogenpartikel, die sie zur anaeroben Energiegewinnung benötigen^[2]. Der durchschnittliche Durchmesser eines Chondrozyten des Gelenkknorpels beträgt 10 Mikrometer (μm)^[7].

In unmittelbarer Umgebung der Chondrozyten ist der Anteil an Proteoglykanen der EZM besonders hoch, was in einer gesteigerten Basophilie resultiert und somit in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung hervorgehoben dunkel erscheint. Diese Region wird als Territorium bzw. „Knorpelhof“ bezeichnet, ergo lässt sich die EZM in territorial und interterritorial aufteilen. Ein Chondrozyt oder eine isogene Gruppe von Chondrozyten mitsamt des umgebenden Knorpelhofes wird als Chondron bezeichnet.^[2]

1.1.1.2 Extrazellulärmatrix

Die EZM im adulten Gelenkknorpel wird von Chondrozyten gebildet und abgebaut. Die Hauptbestandteile sind neben Wasser Kollagenfibrillen und Proteoglykane^[2,8,9].

Die unmittelbare, schmale Peripherie der Chondrozyten wird als Perizellulärmatrix (PZM) bezeichnet. Sie besteht unter anderem aus einem feinen Netz aus Kollagen-VI-Mikrofibrillen und stellt hiermit wahrscheinlich die Verbindung

zwischen Chondrozyten und territorialer Matrix her, welche ihrerseits mit ihren Kollagenfibrillen eine Hülle um jedes Chondron bildet.^[2]

Die interterritoriale Matrix macht den größten Anteil der EZM aus. Der Hauptteil der Kollagenfibrillen besteht aus Kollagen Typ II sowie kleinen Anteilen von Typ IX und XI. Die Proteoglykane sind überwiegend vom Typ Aggrecan, welches zusammen mit Hyaluronan zu großen Aggregaten kombiniert vorliegt. Die großen Proteoglykan-Hyaluronan-Aggregate haben die Fähigkeit, viel Wasser zu binden, wodurch der hohe Wassergehalt von 80 Prozent (%) des Feuchtgewichts zustande kommt. Sie sind mit den Kollagenfibrillen vernetzt, welche ihrerseits eine für den Gelenkknorpel typische, arkadenförmige Ausrichtung vorweisen und somit die Aufteilung des Knorpels in vier Zonen definieren: Von basal nach apikal entspringen sie der mit dem darunter liegenden, subchondralen Knochen verknüpften Mineralisierungszone (Zone IV), wo sie verankert sind und in deren Peripherie die EZM mit Hydroxyapatit-Kristallen durchsetzt ist. Von dort steigen sie radiär auf (Radiärzone, III) und flachen langsam ab (Übergangszone, II), bis sie an der apikalen Knorpelschicht tangential verlaufen (Superficialzone, I).^[2,5,10]

1.1.1.3 Zusammenwirken der Chondrozyten und der EZM

Durch die strukturelle und biochemische Organisation der EZM ist es dem Gelenkknorpel möglich, die hohen Druck- und Scherkräfte auszugleichen, die im Rahmen der Ausübung der Gelenkfunktion entstehen^[11,12]. Die Fähigkeit zum Ausgleich von Druckkräften, die auf die Gelenkoberfläche einwirken, ist der Druckelastizität des Knorpels zuzurechnen. Die Proteoglykan-Hyaluronan-Aggregate nehmen im Gelenkknorpel lediglich ein Fünftel des Raumes ein, den sie aufgrund der durch deren fixierte negative Ladungen bedingten Abstoßung voneinander anstreben. Hierfür sorgen die mit ihnen verknüpften Kollagenfibrillen. Kommt es zur Druckbelastung, so wirkt der hohe gebundene Wasseranteil als Pufferzone und der Knorpel gibt zunächst nach, das interstitielle Wasser strömt durch die molekularen Maschen aus dem Knorpel heraus. Die Grenze der Komprimierbarkeit ist erreicht, wenn die molekularen Maschen zu klein werden und das Wasser den interstitiellen Raum nicht mehr verlassen kann. Kommt es im Rahmen des Wegfalls bzw. der Abnahme der Druckbelastung konsekutiv zur

Dekompression, so wirkt die Abstoßungstendenz der Proteoglykan-Hyaluronan-Aggregate zueinander quasi als Sprungfeder, sodass sich der Gelenkknorpel wieder ausdehnt und Wasser wieder einströmen kann.^[2,11] Durch die tangential, trajektorielle Ausrichtung der Kollagenfibrillen an der Knorpeloberfläche können einwirkende Scherkräfte ausgeglichen werden^[2]. Die Digestion und Erneuerung dieser EZM wird im physiologischen Gelenkknorpel durch die darin befindlichen Chondrozyten sichergestellt.

1.1.2 Degeneration

1.1.2.1 Pathophysiologie der Knorpeldegeneration

Die Funktionalität des Gelenkknorpels ist wesentlich von der quantitativen und qualitativen Zusammensetzung der Proteoglykane und deren Glykosaminoglykanketten sowie vom geordneten Gefüge der Kollagenfibrillen abhängig. Beides kann im Rahmen des natürlichen Alterungsprozesses sowie durch mechanische Einflüsse und biochemische Noxen kompromittiert und insuffizient werden.^[2]

Neben akuten singulären oder repetitiven, meist unvorhersehbaren traumatischen Ereignissen gibt es diverse Einflussfaktoren, die die chronische Knorpeldegeneration bis hin zur manifesten OA begünstigen. Diese Einflüsse umfassen neben genetischer Prädisposition^[13] oder Achsenfehlstellungen insbesondere erworbene Faktoren wie Übergewicht und Bewegungsmangel^[13,14], welche gerade in den Industrienationen eine zunehmende Rolle spielen. Allen genannten Faktoren ist gemeinsam, dass sie einen negativen biomechanischen Effekt auf das Gelenk und den artikulären Knorpel auswirken. Mit zunehmender Degeneration wird das Gewebe weich und aufgeraut durch Einreißungen und Faserung der kollagenen Matrix^[15-18]. Hierdurch werden der Reibungskoeffizient und somit der resultierende biomechanische Stress auf den Knorpel gesteigert, wodurch er noch anfälliger für mechanische Verletzungen wird^[19,20]. Weiterhin setzt der Organismus als Reaktion auf chronische Belastungsreize im Rahmen der vorherrschenden Entzündungssituation proinflammatorische, chemische Faktoren wie matrixabbauender Enzyme und Zytokine, beispielsweise Interleukin (IL)-1 β , IL-6

und Tumornekrosefaktor (TNF), frei, welche die Knorpeldegeneration zusätzlich aggravieren^[2,21].

1.1.3 Osteoarthritis

1.1.3.1 Definition & Epidemiologie

Die manifeste Osteoarthritis beschreibt die klinisch relevante Ausprägung der Knorpeldegeneration in diarthrotischen Gelenken. Basierend auf dem zugrundeliegenden Pathomechanismus wird eine primäre OA ohne eindeutig definierbare Ursache (idiopathische OA) von einer sekundären OA unterschieden, für deren Entstehung diverse singuläre und multiple Pathogenesewege (posttraumatisch, dysplastisch, infektiös, inflammatorisch und biomechanisch) verantwortlich sein können^[22,23]. Die mikro- und makroskopisch sowie radiologisch erkennbaren Degenerationszeichen können hierbei stark variieren.

Die Prävalenz dieser Erkrankung steigt im Zuge des demografischen Wandels jährlich^[14,23]. In einer groß angelegten Studie wurde ein repräsentatives Patientenkollektiv von über 12.000 Studienteilnehmern im Zeitraum von 2010 bis 2013 untersucht. Definiert durch einen Ausprägungsgrad von ≥ 2 nach Kellgren-Lawrence^[23] konnte hierbei bei Patienten im Alter von ≥ 50 Jahren eine Prävalenz der OA des Kniegelenks von 35,1 % mit der höchsten Konzentration bei weiblichen Personen im Alter von ≥ 80 Jahren mit einer Prävalenz von 78,7 % festgestellt werden. Eine positive Korrelation zwischen niedrigem sozioökonomischen Status sowie zwischen klassischen Risikofaktoren wie Alter, weibliches Geschlecht und Übergewicht und dem Risiko der Entwicklung einer Kniegelenk-Arthritis konnte nachgewiesen werden.^[24]

1.1.3.2 Klinik & Diagnostik

Zu den Hauptsymptomen der manifesten OA zählen Schmerzen, Gelenksteifigkeit und resultierende Behinderung bei der Erfüllung von Alltagsaufgaben sowie der Berufstätigkeit^[24-26]. Die Diagnosestellung erfolgt bei Vorliegen typischer klinischer Symptome unter Zuhilfenahme der Röntgenbildgebung bei Vorliegen charakteristischer konventionell-radiologischer Zeichen^[24]. Zur objektivierbaren

Diagnostik und Festlegung des Ausprägungsgrades der Osteoarthrose gibt es diverse Klassifikationsmodelle^[23,27]. Ein anerkanntes Verfahren stellt die auf radiologischen Kriterien basierende Methode nach Kellgren und Lawrence dar. Hierbei wird anhand anerkannter radiologischer Hinweise für das Vorliegen einer Osteoarthrose eine Einteilung in fünf Ausprägungsgrade (0–4) getroffen. Diese radiologischen Kriterien sind: 1) Das Vorhandensein und die Größe von Osteophyten, 2) Das Vorhandensein und die Ausprägung einer Gelenkspaltverschmälerung, 3) Das Vorhandensein und die Ausprägung einer subchondralen Sklerosierung, 4) Das Vorhandensein und die Ausprägung einer gelenknahen Knochen deformität.^[23]

1.1.3.3 Therapie und Prophylaxe

Die Therapie der OA ist stufengerichtet. Zur rein symptomatischen Therapie kommen initial analgetische Maßnahmen zum Einsatz^[28]. Hierunter fallen in der Gruppe der Pharmazeutika vor allem antiinflammatorische Medikamente der Gruppe der nicht-steroidalen Antirheumatika (NSAR). Lebensstiländerungen können primär- und sekundärprophylaktisch wirksam sein. Hierunter fallen unter anderem Gewichtsreduktion, körperliche Aktivität sowie gesunde und ausgewogene Ernährung. Bei ausgeprägter Adipositas sollte ein etwaiger Vorteil einer bariatrisch-chirurgischen Intervention evaluiert werden.^[28,29]

Für länger anhaltende Schmerzlinderung oder gar Beschwerdefreiheit kann eine intraartikuläre Infiltration von Glukokortikoiden, häufig kombiniert mit einem sofort wirksamen Lokalanästhetikum sorgen^[18,30]. Die hieraus resultierenden potentiellen Risiken einer iatrogenen Gelenkinfektion sowie die potentielle hieraus resultierende Verzögerung einer chirurgischen Intervention müssen beachtet und individuell evaluiert werden^[30].

Allen genannten Therapieoptionen ist gemeinsam, dass sie lediglich symptomlindernd sind, eine Ursachenbehebung und somit langfristige Beschwerdefreiheit ist mit diesen Methoden nicht möglich^[18]. Zahlreiche kausale Therapieverfahren mit kurativer Zielsetzung unter Erhalt des betroffenen Gelenks sind derzeit in Erprobung. Primärprophylaktisch sowie zur Therapie geringgradig ausgeprägter

OA vor allem bei jüngeren Patienten mit Achsfehlstellungen können achsenkorrigierende Osteotomien erfolgsversprechend sein^[28,31-34]. Auf molekularer Ebene werden Substanzen getestet, die einen Einfluss auf die inflammatorische Reaktion des Körpers ausüben^[21]. Auf Knorpel Ebene werden regenerative sowie fokale Ersatzverfahren getestet und bereits etablierte Verfahren stetig verbessert. So wird bei kleineren, meist posttraumatischen Knorpeldefekten, häufig im Rahmen einer Arthroskopie eine Mikrofrakturierung durchgeführt, wodurch der subchondrale Knochen zur Bildung eines kollagenreichen Knorpelersatzgewebes angeregt wird^[28,31]. Weiterhin sind knorpelregenerative Verfahren durch Transplantation von mesenchymalen Stammzellen sowie die Weiterentwicklung geeigneter Zellmatrizes Gegenstand aktueller Forschungen^[26]. Zur Defektdeckung bei Knorpelschädigungen moderaten Ausmaßes kommen ebenfalls Knorpeltransplantationsverfahren zum Einsatz. Diese können als alleinige autologe Chondrozytentransplantation (ACT) oder in Form einer Kombinationsmethode mit Spongiosaplastiken zum Einsatz kommen. Allen Knorpelersatz- und Regenerationsverfahren ist jedoch gemeinsam, dass deren bisherige Resultate lediglich kurz- bis mittelfristige Erfolge liefern oder dass deren Einsatzmöglichkeiten beschränkt sind^[31].

Aufgrund der bis dato nur unzureichenden langfristigen Erfolge gelenkerhaltender Maßnahmen stellen für viele Patienten mit manifester, höhergradiger OA noch immer chirurgische Gelenkersatzverfahren die einzige zufriedenstellende Therapiemethode dar^[18,26,35]. Unterschieden wird hierbei zwischen halbseitigem und vollständigen Gelenkersatz, korrespondierend werden Hemi- oder Totalendoprothesen (HEP, TEP) implantiert^[28]. Auch wenn diese Verfahren in vielen Fällen ein zufriedenstellendes Langzeitergebnis liefern, sollte der Entscheid zu dieser Maßnahme unter Berücksichtigung der möglichen peri- und postoperativen Komplikationen wie Narkoserisiko, intraoperative Verletzung wichtiger körpereigener Strukturen, Blutverlust, Infektionen, Thrombosen, Auslockerung und einige mehr kritisch betrachtet und individuell evaluiert werden^[36-41].

1.2 Motivation und Zielsetzung

Osteoarthritis ist in Industrieländern wie am Beispiel der Vereinigten Staaten von Amerika betrachtet nach der koronaren Herzkrankheit die zweithäufigste Ursache für Arbeitsunfähigkeit in der männlichen Bevölkerung im Alter von über 50 Jahren und die OA des Kniegelenks ist die Hauptursache für chronische körperliche Behinderung überhaupt^[18,30]. Neben dem subjektiven körperlichen und sozialen Leidensdruck lastet ein hoher ökonomischer Druck auf den Krankenkassen und den Arbeitgebern. Die ohnehin bereits sehr hohen Kosten des Gesundheitswesens steigen im Zuge des demografischen Wandels enorm^[14]. Die gelenkerhaltenden Therapiemöglichkeiten sind begrenzt und erzielen oft lediglich unzufriedenstellende Resultate. Gelenkersatzverfahren sind irreversible und bisweilen komplikationsträchtige Therapieoptionen^[36-41]. Es besteht daher ein großes Interesse an der Therapie und Prophylaxe der OA. Ein detailliertes Wissen über die Architektur des Gelenkknorpels und ein exaktes Verständnis der verschiedenen Pathogenesewege ist daher essentiell zur Entwicklung neuer und Weiterentwicklung etablierter, gelenkerhaltender Therapieverfahren. Deshalb war es das Ziel dieser Arbeit, eine Technik zur hochauflösenden, zellulären und dreidimensionalen Darstellung des humanen Kniegelenk-Knorpels zu etablieren.

1.2.1 Vorangehende Forschungen

1.2.1.1 Histologische Vorarbeit

Diese experimentelle Studie zur Architektur des Kniegelenk-Knorpels und dessen zellulärer und extrazellulärer Umorganisation im osteoarthrotischen Kniegelenk ist grundsätzlich nicht die erste Arbeit ihrer Art. Den Denkanstoß hierzu haben dieser Studie vorausgehende Publikationen gegeben, die im Rahmen histologischer, zweidimensionaler Darstellung des artikulären Knorpels multipler, unterschiedlicher Gelenke des menschlichen Körpers aus einer Top-Down-Ansicht, ergo der Vogelperspektiven-Ansicht von apikal nach basal, Zellmuster im superficialen Knorpelbereich identifizieren konnten, die entsprechend ihrer Anordnung und Dichte als gelenk- und schichtspezifisch definiert und als „Superficial Chondrocyte Spatial Organisation“ (SCSO) bezeichnet werden konnten^[1,42-44]. Die jeweilige exakte Orientierung dieser SCSO scheint hierbei vom jeweiligen

gelenkspezifischen Belastungsprofil abzuhängen^[1,5,43]. Als Beispiel kann hier das uniaxiale Sprunggelenk des Fußes, ein Scharniergelenk, aufgeführt werden^[45]. Die dort vorherrschenden, abgeflachten Chondrozyten der Trochlea des Talus sind vorwiegend als Einzelzellen und Zellpaare angeordnet^[5], wohingegen die prädominierenden SCSSO in der Femurkondyle des biaxialen Kniegelenks mit seiner zusätzlichen Rotationsachse^[45] Einzelstrings (pSS) zu sein scheinen^[1,5].

In der Übergangszone verlaufen die dort oval geformten Chondrozyten schräg entlang der dort bogenförmig nach apikal abflachenden Kollagenarkaden, ebenso verlaufen sie in den tiefergehenden Knorpelzonen perpendicular zur Knorpeloberfläche in Form von Zellsäulen entsprechend der Kollagenfasern, an die sie gebunden sind. Obwohl bekannt ist, dass diese Knorpelarchitektur zur Erfüllung dessen biomechanischer Funktion essentiell ist^[11,12], so ist noch unbekannt, wie die Etablierung und Aufrechterhaltung dieser strukturellen Organisation durch den Organismus gewährleistet wird^[46].^[1]

In weiterführenden Studien konnte auf Basis der genannten neuen Erkenntnisse zur zellulären Formation in der Superficialzone verschiedener Gelenke weiterführende Forschung am degenerativ veränderten Gelenkknorpel durchgeführt werden. So konnten Roluffs et al. feststellen, dass sich die beschriebenen SCSSO im Sinne einer zellulären räumlichen Umverteilung im Rahmen beginnender und fortschreitender OA verändern. Beobachtet wurden zelluläre Formationen zu Doppelsträngen, den sogenannten „Double Strings“^[47] (pDS) als auch zu kleinen und größeren Zellclustern (pSC, (pLC))^[44]. Die Autoren konnten einen Zusammenhang zwischen dem Grad der OA und dem lokalen Auftreten der jeweiligen SCSSO feststellen. Weiterhin konnten sie beobachten, dass im intakten Gelenkknorpel mit räumlicher Nähe zu einer Defektzone bereits ein gehäuftes Vorkommen von Double Strings (pDS) zu erkennen sei, welche im physiologischen Knorpel nicht auftreten.^[47,48]

Obwohl bekannt ist, dass bereits in frühen Stadien der OA auch die Übergangszone sowie noch tieferliegende Knorpelzonen von degenerativen Prozessen betroffen sind^[49], ist die Zahl der Studien, welche die räumliche Verteilung, Anordnung und Neuordnung der Chondrozyten in eben jenen Knorpelschichten

untersuchen, sehr überschaubar. Diejenigen Studien, die sich lediglich der histologischen Top-Down-Perspektive zur Untersuchung des Gelenkknorpels bedienen, mögen möglicherweise SCSO und zelluläre räumliche Umverteilungen in der oberflächlichsten Knorpelschicht beschreiben, die tatsächlich aber in tieferliegenden Knorpelzonen auftreten. Diese Verzerrung kann durch einen OA-bedingten Substanzdefekt resultieren, wodurch eine tatsächlich tieferliegende Knorpelschicht betrachtet würde.

Aicher und Rolauffs betonen in deren zusammenfassender Erläuterung der neuen Erkenntnisse zur räumlichen Verteilung der Chondrozyten und deren Umverteilung im Zuge der OA die Überlegenheit der konfokalen Mikroskopie zur Beurteilung tiefgreifender SCSO. So argumentieren sie, dass durch diese Diagnostikmethode das Vorhandensein von Zellstrings im Kniegelenk-Knorpel gezeigt werden kann. Somit könne die Aussage einer vorausgehenden Studie, in welcher lediglich mittels serieller Schnittbilder gearbeitet und das Vorliegen der Chondrozyten als Einzelzellen oder Zellpaare beschrieben wurde^[42], widerlegt werden. Die Autoren betonen ausdrücklich die Notwendigkeit des Erhalts der dreidimensionalen Knorpelstruktur zur suffizienten Analyse der Chondrozytenformationen^[5].

Aufgrund einer maximalen Penetrationstiefe von 300 µm sowie der in der Tiefe stark reduzierten Auflösung^[50] sind die Erkenntnisse Rolauffs et al. zur zellulären räumlichen Organisation und Umverteilung bei OA, wenn auch plausibel und von hoher klinischer Relevanz, lediglich auf die Superficialzone beschränkt^[47]. Zur Klärung der Frage, ob diese SCSO tatsächlich auf die anatomische Superficialzone beschränkt sind bzw. ob sie überhaupt in dieser originalen Superficialzone oder lediglich in der Neogelenkoberfläche liegen, sind daher alternative Bildgebungsverfahren notwendig. Diese Bildgebungsverfahren müssen dann eine umfassendere, dreidimensionale Visualisierung des Knorpelgewebes und der darin enthaltenen Chondrozyten sowohl aus der Top-Down-, als auch aus der Seitenansicht simultan erlauben. Weiterhin kann eine derartige Visualisierung des Knorpels ein besseres Verständnis über das räumliche Ausmaß osteoarthrotischer Defektzonen schaffen und etwaige zelluläre oder gar zonale Zusammenhänge

mit eben jenen Knorpeldefekten bestätigen. Zum Belegen oder Widerlegen, dass das zelluläre Re-Modelling im räumlichen Zusammenhang mit einer Knorpelläsion steht ist es notwendig, viel größere, zusammenhängende Knorpelproben zu untersuchen und ebenfalls die randständigen, weit von der Knorpelläsion entfernten Chondrozyten beurteilen zu können. Für diese ist die konfokale Mikroskopie aufgrund der beschriebenen Limitationen ungeeignet.

Als mögliches Verfahren zur Realisierung der beschriebenen dreidimensionalen (3D) Visualisierung wurde eine hochauflösende radiologische Bildgebungsmethode, die Synchrotron-Radiation-Mikro-Computertomografie (SR- μ CT) evaluiert.

1.2.1.2 Synchrotron-Radiation-Mikro-Computertomografie

Die SR- μ CT stellt eine Art der Computertomografie (CT) dar, bei der durch hochenergetische Synchrotronstrahlung sehr hohe Bildauflösungen im Mikrometerbereich möglich sind^[51]. Hierdurch gewinnt dieses Verfahren seit Beginn des 21. Jahrhunderts zunehmender Beliebtheit in den Forschungsbereichen unter anderem der Materialwissenschaften, der Biologie und auch der Medizin^[52-54].

Bei der klinischen CT werden im Rahmen der Aufnahme Quelle und Detektor um den Patienten bewegt. Im Unterschied hierzu sind bei der μ CT Quelle und Detektor ortsfest, stattdessen rotiert das zu untersuchende Objekt im Bereich von Bruchteilen eines Winkelgrades während der Aufnahme. Die Synchrotronstrahlung selbst ist wie die klassische Röntgenstrahlung auch eine sogenannte „Bremsstrahlung“. Verglichen mit einem konventionellen Röntgengerät, bei welchem die Elektronen auf einer kurzen geraden Strecke abgebremst werden, erfolgt im SR- μ CT die Ablenkung der auf beinahe Lichtgeschwindigkeit beschleunigten Elektronen oder Positronen auf einer ringförmigen Bahn mithilfe von Magnetfeldern und Undulatoren, wodurch hochenergetische Bremsstrahlung mit hoher Flussdichte entsteht, die eine deutlich höhere Auflösung erlaubt.^[55]

Zu differenzieren sind zwei verschiedene Verfahren zur Visualisierung: Die gängige Technik des Absorptionskontrastes und das spezielle Verfahren des Phasenkontrastes, welches zur Darstellung Interferenzmuster nutzt, die aus den

unterschiedlichen Brechungsindizes inhomogener Verbindungen resultieren. Beide Verfahren nutzen zur differenzierten Darstellung die unterschiedlichen Kernladungszahlen der einzelnen Elemente innerhalb des zu untersuchenden Gewebes, wobei sich der Absorptionskontrast proportional zur vierten Potenz der Kernladungszahl verhält, während der Phasenkontrast linear mit zunehmender Kernladungszahl ansteigt.^[55,56] Hieraus resultiert, dass der Absorptionskontrast exponentiell steigt, je größer die Kernladungszahl wird, während seine differenzierte Darstellung bei Verbindungen mit niedriger Kernladungszahl geringer ausfällt. Insbesondere bei Verwendung des Absorptionskontrastverfahrens auf Gewebe mit hohem Wasseranteil wie beispielsweise Knorpelgewebe ist daher die Verwendung röntgendichter Kontrastmittel zur besseren Differenzierung der Zellen in vielen Studien empfohlen^[50]. Zehbe et al. haben sowohl die Absorptionskontrastmethode als auch die Phasenkontrastmethode der SR- μ CT mit diversen, anerkannten histologischen Verfahren zur Visualisierung von Knorpelgewebe am Beispiel des bovinen Gelenknorpels verglichen und konnten zeigen, dass hochauflösende Aufnahmen einzelner Chondrozyten selbst ohne Verwendung von röntgendichten Kontrastmitteln mittels Absorptionskontrast möglich ist. Die Nachteile der Kontrastmittelfärbung, bedingt durch deren ungleichmäßige Verteilung im Gewebe durch Diffusionsprozesse, konnten damit vermieden werden.^[57] Das weitere Eingehen auf die Methodik der SR- μ CT würde den Rahmen und das Thema dieser Studie sprengen, für detaillierte Informationen hierzu sei auf die Quellen im Literaturverzeichnis verwiesen.

Müller et al. konnten die Vorteile der hochauflösenden 3D-Visualisierung mittels SR- μ CT durch Aufnahmen von Nierenzellgewebe bestätigen. Als weiteren großen Vorteil dieser Methode gegenüber der histologischen Aufnahme heben die Autoren die Unversehrtheit der Probe mit resultierend fehlenden Artefakten durch Dünnschnittgewinnung hervor.^[50] Ebenfalls zu betonen ist der Vorteil, dass das unversehrte Gewebe zu weiterführenden Experimenten wiederverwendet werden kann. Coan et al. konnten mittels μ CT eine exzellente 3D-Visualisierung von humanen Probenzylindern des humanen Patellarknorpels mit einer der konventionellen Absorptionskontrast-Radiografie deutlich überlegenen Auflösung nachweisen^[58]. In einer Kleintierstudie konnten Piscaer et al. die Anwendung der μ CT

in vivo an lebenden Ratten demonstrieren und somit unter Verwendung von Kontrastmitteln ganze Kniegelenke inklusive degenerativen Veränderungen des Patellarknorpels, Bändern und Menisken darstellen^[59]. Daneben existieren weitere Studien zur in-vivo-Darstellung des osteoarthrotisch veränderten Kniegelenkknorpels im Kleintiermodell^[60]. Allen Verfahren ist gemein, dass zur in-vivo-Aufnahme ein entsprechend großes Sichtfeld in der μ CT eingestellt werden muss und damit deutliche Einbußen in der Auflösung einhergehen. Für Beurteilungen auf zellulärem Niveau sind diese Verfahren daher bis dato nicht geeignet.

1.2.2 Definition der Studienziele

Auf Basis der histologischen Vorarbeit zum Thema der zellulären Organisation im humanen Kniegelenk-Knorpel sowie deren Neuorganisation im degenerativ veränderten Knorpel war es die Zielsetzung dieser Studie, in einem ersten Schritt diese Forschungsergebnisse histologisch qualitativ und quantitativ zu bestätigen. Im Anschluss hierauf sollten diese Erkenntnisse im Rahmen einer hochauflösenden, dreidimensionalen Visualisierung des Knorpelgewebes mittels μ CT bestätigt werden sowie Aussagen darüber getroffen werden können, ob die proponierten, arthrosespezifischen SCSO überhaupt in der eigentlichen Superficialzone vorkommen und falls ja, ob deren Auftreten auf diese Knorpelzone beschränkt ist. Weiterhin sollte das Ausmaß der Knorpeldegeneration räumlich visualisiert und etwaige mit diesen Knorpeldefekten räumlich in Zusammenhang stehenden (S)CSO-Gruppen identifiziert und kartografiert werden. Mit einer solchen dreidimensionalen „Landkarte“ wäre zum ersten Mal eine schichtenübergreifende räumliche Zoneneinteilung des humanen Gelenkknorpels in Assoziation zum Grad der OA gelungen. Durch die 3D-Darstellung von Knorpel und Knorpeldefekten kann es möglich sein, neue Erkenntnisse über und ein besseres Verständnis für die Entwicklung und die Architektur des Gelenkknorpels sowie die Entstehung der Osteoarthrose zu erlangen. Weiterhin wäre diese Visualisierung die erste Anwendung des μ CT-Verfahrens zur Darstellung humanen Gelenkknorpels in dieser Größenordnung mit Auflösung auf Zellniveau. Mit dieser Arbeit sollte eine Technik zur μ CT-basierten, dreidimensionalen Darstellung der Chondrozytenorganisation (SCSO) im humanen Kniegelenk-Knorpel etabliert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tabelle 1: Auflistung der in den Experimenten verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller
Mikrobiologische Werkbank	BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland
Laborabzug	Prutscher Laboratory Systems GmbH, Neudörfel, Österreich
Kryostat CM3050 S	Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland
Vakuumzentrifuge Savant™ Speedvac Concentrator	Bachofer GmbH & Co. KG, Weilheim/Teck, Deutschland
Autoklav	HMC-Europe GmbH, Tüßling, Deutschland
Laborschüttler MTS 4	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen im Breisgau, Deutschland
Magnetrührer RCT B	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen im Breisgau, Deutschland
Präzisionswaage GJ	Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
pH-Meter FiveEasy™ FE20	Mettler Toledo AG, Columbus, OH, USA
Wasserbad W12	GK Sondermaschinenbau GmbH, Arnsdorf, Deutschland
Pipettierhilfe pipetus®	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland
Manuelle Pipette Research® plus (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mikroskop Axio Observer.Z1	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
Synchrotron-Radiation-µCT	Deutsches Elektronen-Synchrotron, Hamburg, Deutschland
Portable, externe Festplatte (4 TB HDD, USB 3.0, USB 2.0)	LaCie S.A., Paris, Frankreich & Porsche Lizenz- und Handelsgesellschaft mbH & Co. KG, Ludwigsburg, Deutschland

Schlagbohrmaschine PSB 650 RA	Robert Bosch GmbH, Gerlingen, Deutschland
Heißklebepistole Gluematic 3002	STEINEL Vertrieb GmbH, Herzebrock-Clarholz, Deutschland
Präzisions-Schieblehre (0–150 mm) Art.-Nr. M825-150	Brüder Mannesmann Werkzeuge GmbH, Remscheid, Deutschland

2.1.2 Gebrauchsartikel

Tabelle 2: Auflistung der in den Experimenten verwendeten Gebrauchsartikel

Artikel	Hersteller
Handschuhe Peha-soft® nitrile, Größe M Art.-Nr.: 9422072	Paul Hartmann AG, Heidenheim an der Brenz, Deutschland
Anatomische Pinzetten (145 mm) Art.-Nr.: BD047R	Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland
Splitterpinzetten (90 mm) Art.-Nr.: BD301R	Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland
Skalpelle, Nr. 21 Art.-Nr.: 02.001.30.021	Feather Safety Razor Co. Ltd, Osaka, Japan
Mikrotom-Klingen S35 Art.-Nr.: 02.075.00.000	Feather Safety Razor Co. Ltd, Osaka, Japan
Hohlmeißelzange (240 mm) Art.-Nr.: FO521R	Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland
Laborflaschen (500 ml, 1000 ml) Art.-Nr.: 21801445, 21801545	DURAN® Group GmbH, Wertheim, Deutschland
Messzylinder, Klasse A (250 ml) Art.-Nr.: 213903604	DURAN® Group GmbH, Wertheim, Deutschland
Schraubbecher (100 ml) Art.-Nr.: 75.562.105	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Gestelle für Reagenzröhrchen (universell) Art.-Nr.: 2-1631	neoLab® Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
Gestelle für Reaktionsgefäße (1,50 ml, 2 ml) Art.-Nr.: 2-2564	neoLab® Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
Polypropylen-Röhrchen CELLSTAR® (15 ml, 50 ml) Art.-Nr.: 188271, 210261	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich

Reaktionsgefäße Safe-Lock (0,50 ml, 2 ml) Art.-Nr.: 0030121.023, 0030120.094	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße 3810X (1,50 ml) Art.-Nr.: 0030125.150	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zellkulturschalen CELLSTAR® (145 * 20 mm, 100 * 20 mm, 60 * 15 mm) Art.-Nr.: 639160, 664160, 628160	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Zellkulturplatten CELLSTAR® (6-Well) Art.-Nr.: 657160	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Serologische Pipetten (10 ml, 25 ml) Art.-Nr.: 357551, 357525	BD Falcon®, San Jose, CA, USA
Pipetten-Filterspitzen, lang (1250 µl) Art.-Nr.: 70.1186.210	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Pipetten-Filterspitzen TipOne® Ultra-Point (100 µl) Art.-Nr.: S1123-1840	STARLAB International GmbH, Hamburg, Deutschland
Pipetten-Filterspitzen SafeGuard (10 µl) Art.-Nr.: 81-1010	VWR International GmbH, Radnor, PA, USA
Adhäsions-Objektträger SuperFrost® plus Art.-Nr.: 03-0060	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland
Deckgläser (Glasdicke: 0,13–0,16 mm) (18 * 18 mm, 24 * 60 mm) Art.-Nr.: 01-1818/1, 01-2460/1	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland
Marker Multimark permanent F (schwarz) Art.-Nr.: 151399	Faber-Castell AG, Stein, Deutschland
Trinkhalme (Außen-Diameter 3,50 mm) Art.-Nr.: MU31026503507	Trinkhalm-Union Matthias Petruschat e.K., Hamburg, Deutschland
SR-µCT Stempel	Deutsches Elektronen-Synchrotron, Hamburg, Deutschland

2.1.3 Chemikalien

Tabelle 3: Auflistung der in den Experimenten verwendeten Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
------------	------------

Instrumentendesinfektionsmittel Se-kusept® PLUS Art.-Nr.: 3011100	Ecolab Deutschland GmbH, Monheim am Rhein, Deutschland
Flächen-Desinfektionsmittel Descosept AF Art.-Nr.: 00-311-010	Dr. Schumacher GmbH, Malsfeld, Deutschland
Hände-Desinfektionsmittel Aseptoman parfümfrei Art.-Nr. DT-403OP-005	Dr. Schumacher GmbH, Malsfeld, Deutschland
Ethanol 99,80 % AnalaR NORMA-PUR® Art.-Nr.: 20821.330	VWR International GmbH, Radnor, PA, USA
Xylene AnalaR NORMAPUR® Art.-Nr.: 28975.325	VWR International GmbH, Radnor, PA, USA
DMEM GIBCO® GlutaMAX™ Art.-Nr.: 31966-021	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
DPBS GIBCO® Art.-Nr.: 14190-094	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Formaldehydlösung 30 %, methanolfrei Art.-Nr.: 4235.2	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamin-tetraessigsäure ≥99 % Art.-Nr.: CN06.3	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid-Plätzchen EMPLURA® Art.-Nr.: 1064621000	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound Art.-Nr.: 4583	Sakura Finetek Germany GmbH, Stauf im Breisgau, Deutschland
Fluorescence Mounting Medium Art.-Nr.: S3023	Dako Deutschland GmbH, Bollschiweil, Deutschland
Paraffin 52–54 °C, reinst Art.-Nr.: CN49.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Klebesticks Ø 11 mm ULTRA Power	STEINEL Vertrieb GmbH, Herzebrock-Clarholz, Deutschland
Trocknungsmittel-Granulat Wisemini	Wisepac Europe GmbH, Bochum, Deutschland
Cell Viability Imaging Kit, Dead Dye (Propidiumiodid) Art.-Nr.: 06432379001	Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) Art.-Nr.: D1306	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland

Eselserum Art.-Nr.: D9662-10ML	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Kollagen-Antikörper COL6A3 (G-18) goat polyclonal IgG Art.-Nr.: sc-131139	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA
Donkey anti-goat IgG-FITC Art.-Nr.: sc-2024	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA

2.1.4 Software

Tabelle 4: Auflistung der in den Experimenten verwendeten Software

Software	Hersteller
Office Word 2016 Professional Plus	Microsoft Corp., Redmond, WA, USA
Office Excel 2016 Professional Plus	Microsoft Corp., Redmond, WA, USA
AxioVision LE 4.8.2.0	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
Avizo Lite 9.0	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Amira 6.0	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Fiji ImageJ	Johannes Schindelin und andere
VGStudio MAX 2.2	Volume Graphics GmbH, Heidelberg, Deutschland
SAP IS-H*med	Cerner Corporation, North Kansas City, MO, USA
Meshlab	National Research Council of Italy CNR, Rom, Italien
MeVisLab	MeVis Medical Solutions AG, Bremen, Deutschland
SPSS Statistics 23	IBM Corp., Armonk, NY, USA
EndNote X7	Thomson Reuters Corp., Toronto, Kanada
Inkscape	Inkscape Community
Photoshop	Adobe Inc., San Jose, CA, USA
Illustrator	Adobe Inc., San Jose, CA, USA
Acrobat Pro DC	Adobe Inc., San Jose, CA, USA

2.1.5 Sonstige Materiale

Tabelle 5: Auflistung der in den Experimenten verwendeten sonstigen Materiale

Material
Computer mit erhöhtem Arbeitsspeicher (64 RAM)
Computer
Smartphone Samsung Galaxy S3
Kühlschrank
Gefrierschrank
Schere
Pinsel
Objektträgermappe
Stahllineal
Aufbewahrungsboxen aus leeren Pipettenspitzenverpackungen
Magnetrührstäbchen
Einweg-Kunststoffpulverschalen zum Abwiegen solider Stoffe
Aluminiumfolie
Haargummi
DPBS-Verpackungsteile
Unterlage schwarz
Klebeband
Feuerzeug
Papierhandtücher
Bosch Schleifklötze verschiedener Körnung
Bosch Schleifblätter verschiedener Körnung
Polieraufsatz Bohrmaschine
Leitungswasser
Doppelt destilliertes Wasser

2.2 Methoden

2.2.1 Studiendesign

2.2.1.1 Genehmigung der Studie

Für die ordnungsgemäße Durchführung der Studie wurde ein entsprechender Antrag bei der Ethikkommission der Eberhard Karls Universität in Tübingen, Deutschland, eingereicht und bewilligt (Projektnummer 171/2014BO2). Das in der Studie verwendete Gewebe entspricht den bei operativer Implantation von Totalendoprothesen im arthrotisch veränderten, humanen Kniegelenk obligatorisch und studienunabhängig anfallenden Resektaten der Femurkondylen. Diese Resektate wären ohne weitere Verwendung vernichtet worden.

2.2.1.2 Aufklärung und Einwilligung der Studienteilnehmer

Die Studienteilnehmer wurden am Vortag der Operation über den Hintergrund der Studie, den Verwendungsbedarf der Kondylenresektate, die Unbedenklichkeit der Teilnahme, die Unverbindlichkeit der Teilnahme sowie über das jederzeit ausführbare Widerrufsrecht aufgeklärt. Im Falle der Einwilligung wurde ein entsprechendes Formular unterzeichnet.

2.2.1.3 Erhebung personenbezogener Informationen

Die Protokollierung der personenbezogenen Daten fand in pseudonymisierter Form statt. Die Pseudonymisierungsliste wird in einem verschließbaren Aktenschrank sicher verwahrt. In der Pseudonymisierungsliste wurden personenbezogene Daten wie Fallnummer, Pseudocode, Zu- und Vorname, Geschlecht, Geburtstag, Diagnose, Operationsdatum, Operationsprozedur, eventuell vorhandene Bildgebungsergebnisse, ein eventuell vorliegendes Trauma sowie zusätzliche Bemerkungen protokolliert.

2.2.1.4 Ablauf der Studie

Die bei operativer Totalendoprothesenimplantation gewonnenen Femurkondylenresektate wurden im Labor zunächst makroskopisch auf das Vorhandensein charakteristischer und studienrelevanter Arthrosemerkmale untersucht und,

abhängig davon, für die weitere Bearbeitung freigegeben. Unbrauchbares Gewebe wurde ordnungsgemäß entsorgt.

Relevante Resektate wurden auf eine festgelegte Probengröße präpariert, fixiert und anschließend dekalzifiziert, um röntgendichtes Kalzium aus dem subchondralen Knochen zu lösen und Dünnschnitte aus der Seitansicht, „Vertikalsicht“ oder anatomisch gemäß derer Lokalisation in situ „Sagittalsicht“ gefertigt zu können. Die gewonnenen Dünnschnitte wurden fluoreszierend gefärbt und mikroskopisch im Rahmen einer ersten zweidimensionalen, qualitativen Analyse evaluiert und, basierend darauf, softwaregestützt digitalisiert oder mitsamt der Probe verworfen.

Die verbliebenen, relevanten Proben wurden daraufhin für die μ CT vorbereitet. Hierfür wurden einige Proben mit röntgendichtem Kontrastmittel gefärbt, andere verblieben nativ. Einige wurden getrocknet (dehydratisiert), andere verblieben hydratisiert.

Anschließend erfolgte zur Evaluierung der von den genannten Bearbeitungsschritten optimalen Probenvorbereitung sowie zur Testung des Verfahrens selbst eine vorläufige sowie daraufhin die definitive radiologische Messung der Proben mittels SR- μ CT. Hierbei wurde eine 3D-Visualisierung des Knorpels bewirkt.

Um vergleichbare Aussagen der dreidimensionalen Aufnahmen mit den bisherigen, histologischen Erkenntnissen treffen zu können war es notwendig, die getrockneten Proben zu rehydratisieren und erneut Dünnschnitte aus der Seitansicht anzufertigen. Nur so konnte sichergestellt werden, dass in beiden Analysen dasselbe Gewebe betrachtet wird. Diese Dünnschnitte wurden ebenfalls fluoreszierend gefärbt und mikroskopisch digitalisiert. Die neuen Dünnschnitte mussten akribisch visuell mit den Dünnschnitten vor der μ CT verglichen werden, um etwaige Änderungen der Probenmorphologie und Zellverteilung durch die De- und Rehydratisierungsprozesse aufdecken zu können. In jenem Fall wäre das Ziehen von Rückschlüssen bei vergleichender Auswertung mit den dreidimensionalen Aufnahmen mit einer potentiellen Fehlerquelle behaftet gewesen.

Nach dieser Kontrollanalyse erfolgte der Vergleich der in den zugrundeliegenden Vorstudien beschriebenen SCSO in den entsprechenden Arealen im degenerativ veränderten Knorpel mit den neuen Aufnahmen. Hierzu wurden die verbleibenden Probenblöcke analog der Vorstudie aus der Vogelperspektive, nachfolgend auch „Top-Down-Ansicht“, „Horizontalsicht“ oder anatomisch entsprechend derer Lokalisation in situ „Axialsicht“ bzw. histologisch „Apikalsicht“ genannt, mikroskopisch betrachtet.

Anschließend erfolgte ein Vergleich der Resultate der Vorstudien mit den neuen Aufnahmen aus der Seitansicht, um diese proponierten SCSO in einer zweiten Ebene reidentifizieren und somit aussagekräftiger morphologische Darstellungen des Ausmaßes der Knorpeldegeneration generieren zu können.

Durch statistische Tests zur Zellverteilung sollte histologisch das Vorhandensein der beschriebenen Degenerationszonen mit den entsprechenden SCSO belegt werden.

Eine große qualitative 3D-Analyse der μ CT-Aufnahmen erfolgte hieraufhin über Segmentationsprozeduren softwaregestützt.

Abschließend wurde eine quantitative 3D-Analyse der μ CT-Aufnahmen erprobt.

2.2.2 Gewebegewinnung

Die in der Studie verwendeten Femurkondylenresektate konnten bei operativem Einsatz von Totalendoprothesen in der Orthopädischen Universitätsklinik und der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik (BG Klinik) in Tübingen, Deutschland, sowie der Winghofer Klinik in Rottenburg, Deutschland, gewonnen werden.

Die Resektate wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) eingelegt und für wenige Stunden (h) in einem Schraubbecher zwischengelagert. Die weitere Bearbeitung erfolgte im Zellbiologischen Forschungslabor der Orthopädischen Klinik in Tübingen, Deutschland.

2.2.3 Lagerung

Die Lagerung des Gewebes, das momentan keinem Bearbeitungsprozess unterlag, war abhängig vom aktuellen Bearbeitungsstand. Wasserhaltiges Gewebe wurde in Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS) in Polypropylen-Röhrchen in einem Kühlschrank bei einer Temperatur von vier Grad Celsius (°C) gelagert. Dehydratisiertes Gewebe wurde in trocknungsmittelhaltigen Eppendorf-Tubes in einem Schrank bei Zimmertemperatur gelagert. Gewebedünnschnitte, die bereits auf Objektträgern aufgebracht waren, wurden in einer Objektträgermappe bei 4 °C gelagert.

2.2.4 Makroskopische Evaluation

Die erste, makroskopische Evaluation der Proben war von zwei Kriterien abhängig, dem Vorhandensein von bestimmten, arthrosespezifischen Knorpelveränderungen sowie dem Einhalten der vorgegebenen Sichtfeldmaße des Computertomografen.

Bei dem Ziel, qualitative und quantitative Aussagen über die verschiedenen Degenerationsgrade der Proben treffen zu können war es notwendig, Gewebebereiche zu identifizieren, die bereits makroskopisch das Vorhandensein aller Degenerationsgrade vermuten ließen. Folglich kamen nur diejenigen Gewebestücke für eine weitere Bearbeitung in Frage, die das Vorhandensein einer intakten, physiologischen Knorpelschicht mit stetiger Abnahme der Schichtdicke bis hin zum freiliegenden, subchondralen Knochen aufwiesen.

Das Vorhandensein dieser morphologischen Kriterien allein war nicht ausreichend. Das Vorkommen innerhalb eines Bereichs mit definierten Maßen, den sogenannten Sichtfeldmaßen des Computertomografen war obligat, um eine vollständige Abbildung der verschiedenen Zonen in jeweils einer Aufnahme gewährleisten zu können. Die Sichtfeldmaße waren abhängig von der angestrebten Bildauflösung. Je höher die Bildauflösung ausfallen sollte, desto geringer musste der maximale Probendurchmesser gewählt werden. Der maximale Probendurchmesser entsprach der maximalen Strecke, die der Tomografenstrahl zur Probenpenetration zurücklegen konnte, ohne die angestrebte Auflösung zu

unterschreiten. Durch die Rotation der Probe in der μ CT entsprachen die Maße einem Zylinder, wobei der Grundflächendurchmesser den maximalen Proben-durchmesser darstellte.

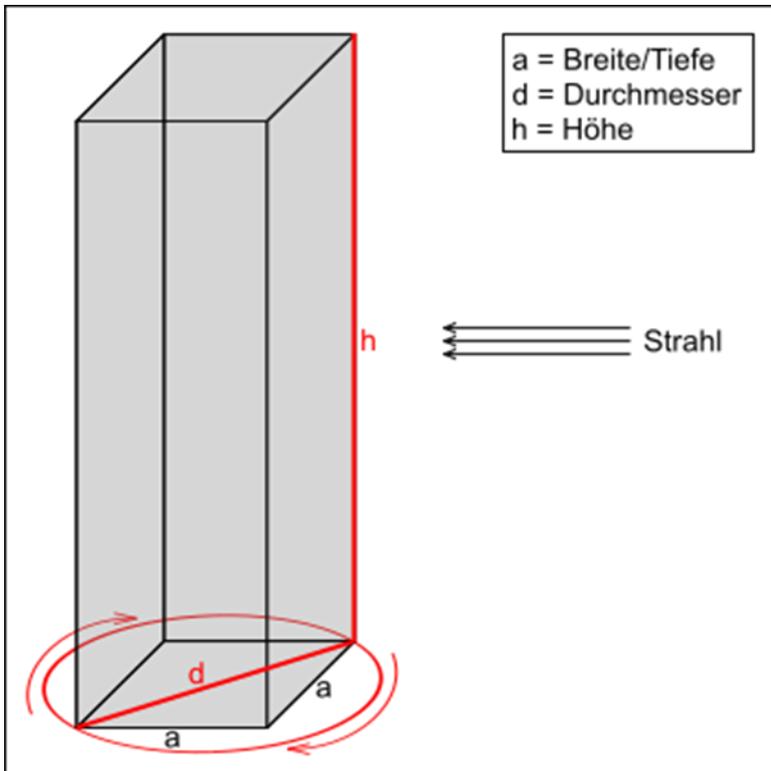


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Probe in der μ CT.

Aufgrund der quaderförmigen Morphologie der aus den Femurkondylenresektanten extrahierten Proben mit quadratischer Grundfläche konnten über den Satz des Pythagoras:

$$a^2 + b^2 = c^2$$

zur Berechnung der Seitenlängen eines rechtwinkligen Dreiecks anhand der gegebenen Hypothenusenlänge (Abbildung 1, Probendurchmesser d) die Kathetenlängen (Abbildung 1, Probenbreite-/tiefe a) berechnet werden:

$$2a^2 = d^2$$

$$a = \sqrt{\frac{d^2}{2}}$$

Für die bei den Aufnahmen angestrebte Auflösung von 1,30 μm ergaben sich somit die in Tabelle 6 aufgelisteten Probengrenzwerte:

Tabelle 6: Maximalmaße der Proben in der μCT

	Auflösung [μm]	max. Probendurchmesser [mm]	max. Probenbreite/tiefe [mm]
Sichtfeld:	1,30	3,70	2,62

Die Probentiefe entsprach der Strecke von der probenspezifischen Knorpeloberfläche bis zum subchondralen Knochen. Ein in seiner Dicke minimal gehaltener Knochenstock musste flächendeckend vorhanden sein, damit das vollständige Vorhandensein der gesamten Mineralisierungszone des Knorpels garantiert und somit auch die hochgradigen Knorpelläsionen erfasst werden konnten. Aufgrund der Tatsache, dass Knorpelgewebe beim Dehydratisierungsprozess etwa 20–25 % seines Volumens verliert^[61], konnten die Maße zur Probenextrahierung entsprechend angepasst werden. Hierfür wurden die Resektionsmaße um etwa 25 % der Sichtfeldmaße erweitert. Die Resektionsbreite musste zusätzlich um fünf Millimeter erweitert werden, um genügend Material für Seitansicht-Dünnschnitte sicherstellen zu können. Die Probenhöhe konnte variabel gewählt werden, wobei durch die Strahlhöhe des Röntgenstrahls in der μCT bedingt blockweise gemessen wurde. Angestrebt wurde eine Gesamthöhe von etwa 20 mm. Die daraus resultierenden Maße zur Probenextrahierung sind in Tabelle 7 aufgeführt:

Tabelle 7: Kalkulierte Maximalmaße der Proben bei Extrahierung aus den Kondylenresektaten

	Probenbreite [mm]	Probentiefe [mm]	Probenhöhe [mm]
Sichtfeld:	8,49	3,49	26,67

Konnten die vorausgesetzten morphologischen Kriterien nicht erfüllt werden, so wurde das Gewebe verworfen und vernichtet.

Frühzeitig konnte festgestellt werden, dass Form und Lokalisation des Kondylenresektates eine entscheidende Rolle bei der makroskopischen Evaluation spielen.

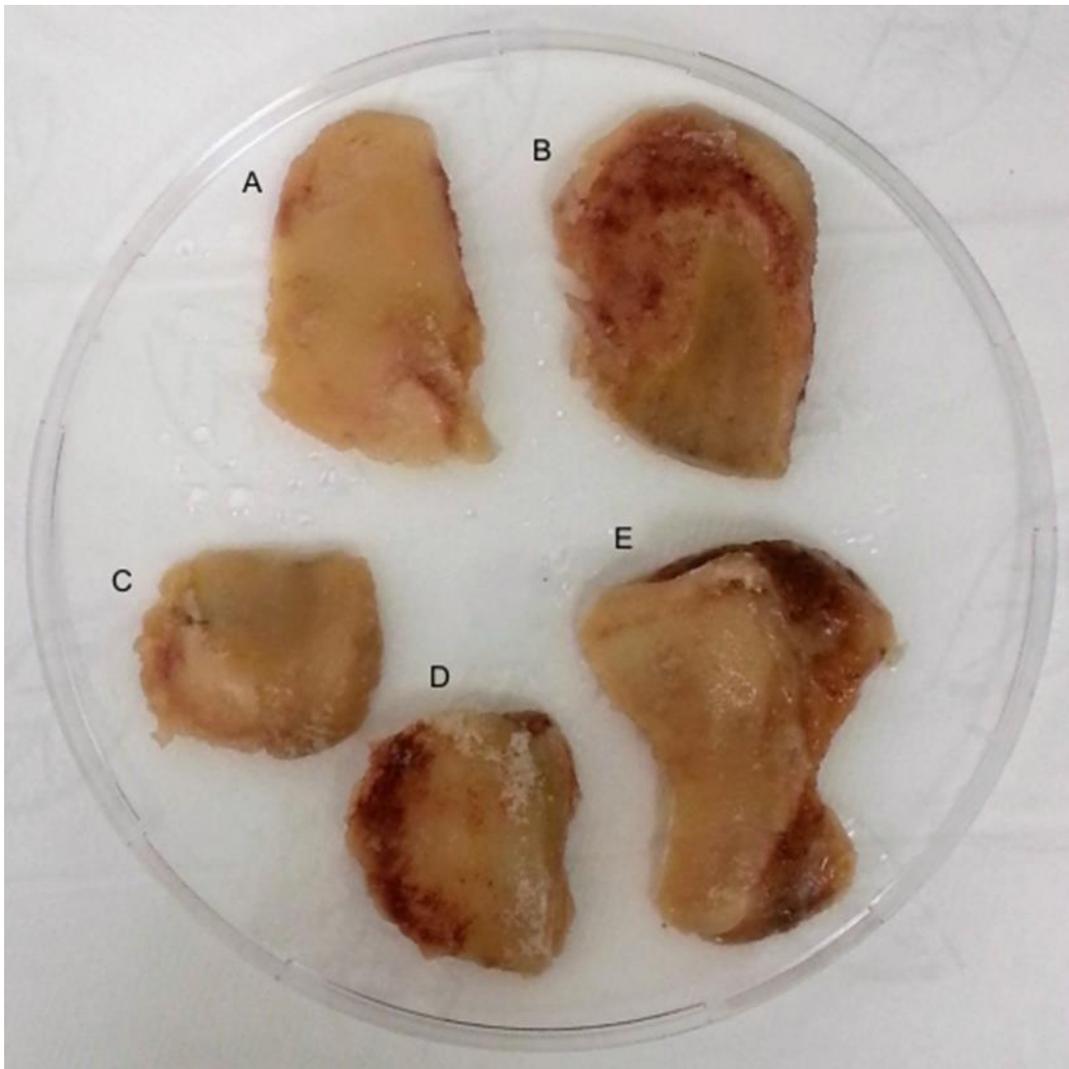


Abbildung 2: Übersicht der bei operativer Implantation von Totalendoprothesen anfallenden Femurkondylenresektate. A+B: Distales Femurkondylenresektat C+D+E: Vier-in-Eins-Schablonenresektat.

Die Gewebestücke eines „Vier-in-Eins-Schablonenresektates“ wiesen bedingt durch die Sägeföhrung durch die Femurkondyle eine deutliche Krümmung auf, was eine Vereinbarkeit mit den vorausgesetzten Probenmaßen in den meisten Fällen bereits unmöglich machte. Bei der makroskopischen Evaluation konnte weiterhin festgestellt werden, dass in diesen Resektaten quasi keine höhergradigen Knorpelläsionen auffindbar waren. Die Gewebestücke der distalen

Femurkondylenresektate dagegen wiesen kaum relevante Krümmungen auf und eigneten sich daher gut, um Gewebeproben zu extrahieren, die den definierten Maßen entsprachen. Aufgrund derer Lokalisation in der Hauptbelastungszone der Femurkondyle bestand eine hohe Wahrscheinlichkeit für das Vorhandensein aller Knorpeldegenerationsstufen. Allerdings musste festgestellt werden, dass diese Gewebestücke häufig keine Areale mit intakter Knorpelschicht mehr aufwiesen. Nicht selten waren große Areale vollständig frei von Knorpelgewebe, sodass lediglich der subchondrale Knochen zu erkennen war. Jene knorpelfreien Gewebestücke konnten folglich ebenfalls direkt von der weiteren Bearbeitung ausgeschlossen werden.

Die makroskopische Beurteilung und Präparation des Gewebes fand in einer hierfür vorgesehenen Umgebung in einer Sterilbank statt. Zur Abmessung der Gewebeareale wurde ein flexibles Stahllineal verwendet.

2.2.4.1 Extrahierung der Proben

Zur Extrahierung der makroskopisch detektierten Areale aus dem Femurkondylenresektat wurde eine Hohlmeißelzange verwendet. Im ersten Schritt wurde das subchondrale Knochengewebe bis auf etwa 1 mm ausgedünnt. Nachfolgend wurde mittels eines Luers ein kubischer Block entlang der kinematischen uniaxialen Bewegungsrichtung aus dem Resektat herausgekniffen. Um hierbei Gewebeschädigungen zu vermeiden, musste auf hartes Fixierungsinstrumentarium verzichtet werden. Aufgrund der häufig stark fortgeschrittenen Sklerosierung des subchondralen Knochens konnten keine Schneidewerkzeuge eingesetzt werden, weshalb die feine Glättung des Knochens erst nach dem in Folgeschritten stattgefundenen Dekalzifizierungsprozess erfolgte.



Abbildung 3: Unbearbeitete Probe nach Extrahierung aus dem Femurkondylenresektat.

Die Bearbeitung fand in Zellkulturschalen statt. Abbildung 3 zeigt eine solche extrahierte Probe aus einem Kondylenresektat.

Die Proben wurden für den unmittelbar folgenden Bearbeitungsschritt in leere Polypropylen-Röhrchen platziert.

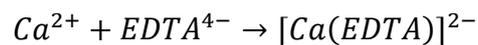
2.2.4.2 Chemische Fixierung

Zur andauernden Erhaltung des extrahierten Gewebes wurden die Proben anschließend konservierend fixiert. Als Fixierungslösung diente eine 4%ige Paraformaldehydlösung (PFA), die durch Verdünnung einer 30%igen, methanolfreien Formaldehydlösung mit DPBS erreicht wurde.

Die PFA-Lösung wurde bei Zimmertemperatur in Laborflaschen gelagert. Die Proben verweilten für 24 h in PFA/DPBS (pH 7) bei 4 °C. Anschließend erfolgte eine Waschung der Proben in DPBS bei Raumtemperatur in Bewegung auf einem Laborschüttler für circa zwei h in Polypropylen-Röhrchen, um verbliebene Formaldehydrückstände zu entfernen.

2.2.4.3 Chemische Dekalzifizierung

Sowohl für die nachfolgende Dünnschnittanfertigung, als auch zur Artefaktvermeidung in der μ CT war es notwendig, das Kalzium aus dem knöchernen Probenanteil herauszulösen. Für diesen Dekalzifizierungsprozess wurde eine etwa 20%ige Lösung aus Ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA) in doppelt-destilliertem Wasser (*dd H₂O*) verwendet. EDTA ist ein Chelatbildner und besitzt die Fähigkeit, die im Knochen enthaltenen Kalziumionen in einem Komplex zu binden:



Da sich EDTA solid erst ab einem neutralen pH von 7 in Wasser zu lösen beginnt, musste die saure EDTA-Lösung durch Zutitrieren von Natronlauge (Natriumhydroxid, NaOH) alkalisiert werden. Um den im humanen Körper vorherrschenden, physiologischen Blut-pH zwischen 7,35 und 7,45 nicht zu überschreiten, musste das Titrieren unter engmaschiger Kontrolle durch einen pH-Meter erfolgen. Die Verzerrung des prozentualen EDTA-Gehalts am Gesamtvolumen durch Zugabe von NaOH-Lösung wurde bei der Wasserzugabe berücksichtigt. Die fertiggestellte EDTA-Lösung wurde anschließend autoklaviert und bei Zimmertemperatur in Laborflaschen gelagert.

Bei maximaler Ausdünnung des subchondralen Knochengewebes und zweitägigem Wechsel der EDTA-Lösung betrug die totale Dekalzifizierungsdauer unter optimalen Bedingungen, also bei 37 °C und in Bewegung, zwischen zwölf und 14 Tagen. Versuche mit einer etwa 10%igen EDTA-Lösung zeigten eine deutlich länger andauernde Dekalzifizierungsperiode zwischen 20 und 22 Tagen.

Um die optimalen Bedingungen für den Dekalzifizierungsprozess zu erreichen, wurden die Proben in Polypropylen-Röhrchen auf einem Laborschüttler bei einer

Temperatur von 37 °C gelagert. Anschließend erfolgte eine erneute Waschung der Proben in DPBS bei Raumtemperatur in Bewegung für etwa zwei Stunden in Polypropylen-Röhrchen, um verbliebene EDTA-Rückstände und EDTA-Kalzium-Komplexe zu entfernen.

2.2.5 Mikroskopische Evaluation

Eine zweite, mikroskopische Beurteilung der Proben war notwendig um die makroskopisch vermutete OA durch einen histologischen Nachweis korrespondierender zellulärer sowie extrazellulärer Degenerationsmerkmale zu verifizieren. Um die nachfolgenden, zeitintensiven Färbungs- und Dehydratisierungsschritte nicht umsonst investiert zu haben, wurde diese zweite Evaluation vor der weiteren Bearbeitung durchgeführt. Durch den vorangegangenen Dekalzifizierungsprozess war es nun möglich, den Knorpel-Knochenkomplex für die Mikroskopie zu präparieren.

2.2.5.1 Dünnschnittgewinnung

Die Dünnschnitte für die Mikroskopie wurden durch Verwendung eines Kryostaten gewonnen. Die Proben wurden auf einen Stempel platziert und in Tissue-Tek®, ein speziell hierfür vorgesehenes Medium, eingebettet. Anschließend wurde der Stempel in das Geräteinnere bei einer Temperatur von -18 °C platziert, sodass das Medium gefrieren und damit die Probe am Stempel fixiert werden konnte. Es musste darauf geachtet werden, dass genügend Tissue-Tek® aufgebracht wurde, um möglichst viel Oberfläche des Stempels zu bedecken. Bei zu geringer Kontaktfläche konnte es passieren, dass sich der Medium-Proben-Komplex beim Vorbeigleiten an der Kryostatklinge vom Stempel löste. Selbiges Problem konnte bei einer inhomogenen Verteilung des Mediums auftreten, weshalb darauf geachtet werden musste, Luftblaseneinschlüsse im Medium zu vermeiden.

Der Proben-Stempel-Komplex verweilte für den daraufhin folgenden Gefriervorgang des Fixiermediums im Kryostaten. An der schneeweißen Verfärbung des zuvor klaren, viskösen Mediums konnte festgestellt werden, dass der

Gefriervorgang abgeschlossen war. Die beschriebenen Arbeitsschritte sind in Abbildung 4 veranschaulicht.

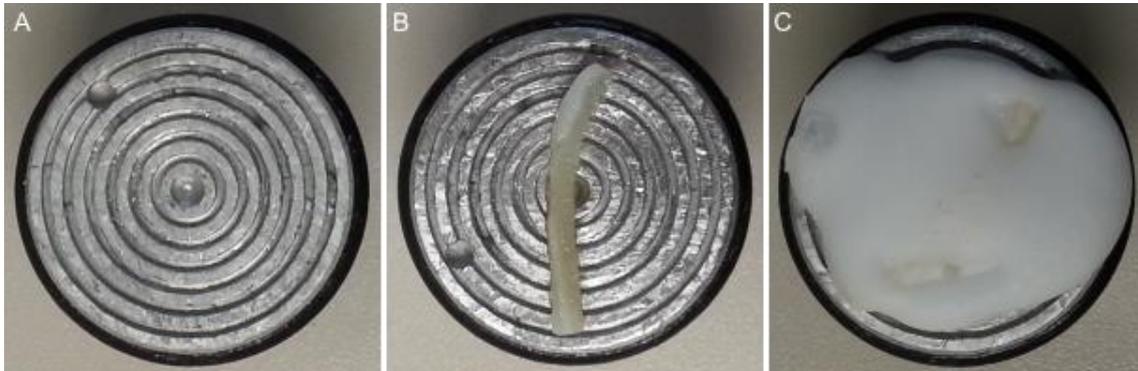


Abbildung 4: Unbeladener Kryostatstempel (A), Kryostatstempel mit Probe (B) und in Medium eingebettete Probe (C).

Die quaderförmige Probe wurde mit der langen Seite parallel zur Klinge in den Stempelhalter eingespannt. Es konnte festgestellt werden, dass somit das Auftreten einer Probenablösung vom Stempel verringert werden konnte.

Das Vorbeigleiten an der Kryostatklinge wurde mit mittlerer Geschwindigkeit durchgeführt. Zu langsames Schneiden erhöhte die Wahrscheinlichkeit einer Probenablösung vom Stempel, während zu schnelles Schneiden häufig kantige Artefakte und Abrisse in den Dünnschnitten verursachte. Als geeignet stellte sich eine Schnittdicke von 70 μm heraus. Dickere Schnitte führten zu schlechteren Diskriminierungsmöglichkeiten der histologischen Strukturen, während dünnere Schnitte methodenbedingt nicht ohne Struktureinbußen durchführbar waren.

Nachdem durch initiales, mehrmaliges Schneiden Unregelmäßigkeiten der Probenoberfläche beseitigt worden waren und eine plane Oberfläche gegeben war, konnten 10–20 Dünnschnitte aus der Seitansicht der Proben für die nachfolgende Mikroskopie gewonnen werden. Die Dünnschnitte wurden mit einer sterilen Pinzette in DPBS-haltigen Polypropylen-Röhrchen gelagert, wobei darauf zu achten war, dass die Pinzette nur in Kontakt mit dem den Dünnschnitt umgebenden gefrorenen Tissue-Tek® kam, um Gewebeschäden zu vermeiden. Die verbliebene Probe wurde bei Raumtemperatur in Zellkultur-Schalen für etwa 15 Minuten (min) gelagert, bis das anhaftende Tissue-Tek® geschmolzen war und mit DPBS

abgespült werden konnte. Die Probe wurde in ein DPBS-haltiges Polypropylen-Röhrchen gelagert.

Zum Schutz vor Keimbesiedelung wurden die Stempel vor und nach Verwendung mit 70%igem Ethylalkohol abgespült und luftgetrocknet.

2.2.5.2 Färbung mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol

Um die Zellen, genauer gesagt die Zellkerne (Nuclei), bei der Mikroskopie hervorheben zu können, wurden die Dünnschnitte mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) gefärbt (Ex_{max} 358 nm, Em_{max} 461 nm). Durch die Eigenschaft dieses fluoreszierenden Farbstoffes, an Desoxyribonukleinsäure (DNS) zu binden und bei einem Emissionsmaximum von 461 Nanometer (nm) mit blauer bis cyaner Farbe zu leuchten, konnten die Nuclei und somit die Lokalisation der Chondrozyten in der sie umgebenden EZM identifiziert werden.

Um die benötigte Antikörpermenge so gering wie nötig zu halten, mussten für den Färbeprozess Gefäße verwendet werden, die zur Morphologie der Dünnschnitte passten. Breite Gefäßvolumina forderten ein größeres Füllungsvolumen, um die Probe komplett einzuschließen und damit eine hinreichende Färbung zu ermöglichen. Dünne Gefäßvolumina bargen die Gefahr der Adhäsion des Dünnschnitts an der Gefäßwand, was zu einer unzureichenden Kontaktfläche der Antikörperlösung führte. Für die Dünnschnitte mit annähernd 20 mm Höhe und zwischen 3,20 und 3,50 mm Breite konnte festgestellt werden, dass bei einer angestrebten Antikörperlösungsmenge von 1 Mikroliter (μ l) in einer Konzentration von 1 μ l pro Milliliter (ml) DPBS Reaktionsgefäße mit 1,50 ml Volumenfassung die vorausgesetzten Bedingungen erfüllten.

Für den Färbeprozess wurden leere Reaktionsgefäße mit 1,50 ml Fassungsvermögen mit 1 ml DPBS in oben genannter Konzentration befüllt. Anschließend wurden die Dünnschnitte mithilfe von Pipetten-Filterspitzen in die Reaktionsgefäße platziert. Für jede Probe wurden zwei Dünnschnitte in jeweils separaten Reaktionsgefäßen gefärbt, um bei Artefaktbildung oder insuffizienter Färbung einen zweiten Dünnschnitt parat zu haben. Auf die Verwendung von Pinzetten wurde zum Schutz der Dünnschnitte verzichtet. Das bereits im Reaktionsgefäß

vorhandene DPBS half bei der Ablösung der Dünnschnitte von den Pipetten-Filterspitzen.

Da zur Kontrolle der korrekten Platzierung des Dünnschnitts im Reaktionsgefäß unter Sicht gearbeitet werden musste, wurde die Antikörperlösung erst anschließend dazugegeben, um die Antikörper vor ultravioletter Strahlung (UV-Strahlung) zu schützen. Um die oben genannte Konzentration von 1 μ l Antikörperlösung in 1 ml DPBS zu erreichen, wurden 1 μ l einer DAPI -Lösung der Konzentration von 5 Milligramm (mg) pro ml in das Reaktionsgefäß pipettiert. Nach einmaliger Invertierung folgte die unmittelbare Ummantelung des Gefäßes mit herkömmlicher Aluminiumfolie.

Die Färbedauer betrug 5 min bei Raumtemperatur. Anschließend erfolgte ein zweimaliger Waschvorgang der Dünnschnitte mit 2 ml DPBS in Reaktionsgefäßen mit einem Fassungsvermögen von 2 ml für jeweils 5 min bei Raumtemperatur auf einem Laborschüttler.

2.2.5.3 Anfertigung der Aufnahmen

Die gefärbten Dünnschnitte wurden unter Schutz vor UV-Strahlung mithilfe von Pipetten-Filterspitzen auf separate Objektträger aufgebracht und an der Luft bei Zimmertemperatur getrocknet. Es wurde darauf geachtet, dass die Dünnschnitte keine Wellen schlugen, da diese bei der Mikroskopie zu streifenförmigen Artefakten führen konnten. Vorsichtiges Ausstreifen der noch feuchten Dünnschnitte auf dem Objektträger mittels einer Pipetten-Filterspitze zeigte eine Reduzierung der Wahrscheinlichkeit des Auftretens solcher Artefakte.

Nach dem Trocknungsvorgang wurden die Dünnschnitt mit einem Tropfen Mounting-Medium beträufelt und mittels eines Deckglases mit den Maßen 24 * 60 mm und einer Glasdicke etwa 0,13–0,16 mm bedeckt. Es musste sichergestellt werden, dass Luftblaseneinschlüsse vermieden wurden. Makroskopisch sichtbare Luftblasen unterhalb des Deckglases konnten durch vorsichtiges Hin- und herschieben des Deckglases aus dem Sichtfeld geschoben werden. Die beladenen Objektträger wurden in einer vor UV-Strahlung schützenden Objektträgermappe gelagert.

Zur Mikroskopie wurde das Fluoreszenzmikroskop Axio Observer Z1 verwendet. Konnten mikroskopisch keine Artefakte festgestellt werden, so wurde zunächst von jedem Dünnschnitt eine Mosaik-Übersichtsaufnahme erstellt. Dabei wurde unter Verwendung der Computersoftware AxioVision LE 4.8.2.0 mit integrierter MosaiX Bildaufnahme-Funktion der komplette Dünnschnitt digital erfasst und in ein Gittersystem aufgeteilt. Anschließend wurden in regelmäßigen Abständen Fokuspunkte gesetzt und manuell durch Variieren des Objektivabstands scharf gestellt (Abbildung 5). Anhand dieser Einstellungen wurden die Objektivabstände der restlichen Gittersektoren rechnerisch ermittelt.

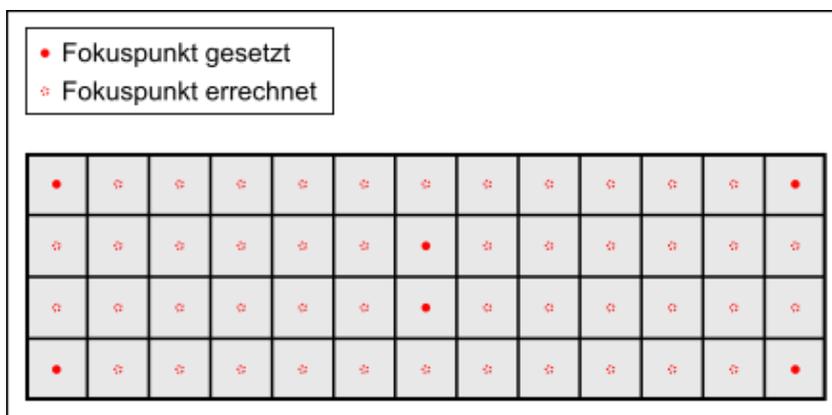


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Rasterung und Fokusdefinierung eines Gewebedünnschnitts mittels AxioVision.

Durch die automatische Berechnung der restlichen Gittersektoren konnte unter erheblicher Zeitersparnis eine für die Probenevaluation ausreichende Übersichtsaufnahme erstellt werden.

Durch die Wahl eines angemessenen Überlappungsgrades vor der Aufnahme konnten die scharfen und prominenten Kanten der Einzelbilder im Mosaik nachträglich mittels AxioVision geglättet werden. Die Ermittlung des geeigneten Überlappungsgrades erfolgte durch Ausprobieren. Abbildung 6 demonstriert die Unterschiede der Kantenglättung bei verschiedenen Überlappungsgraden.

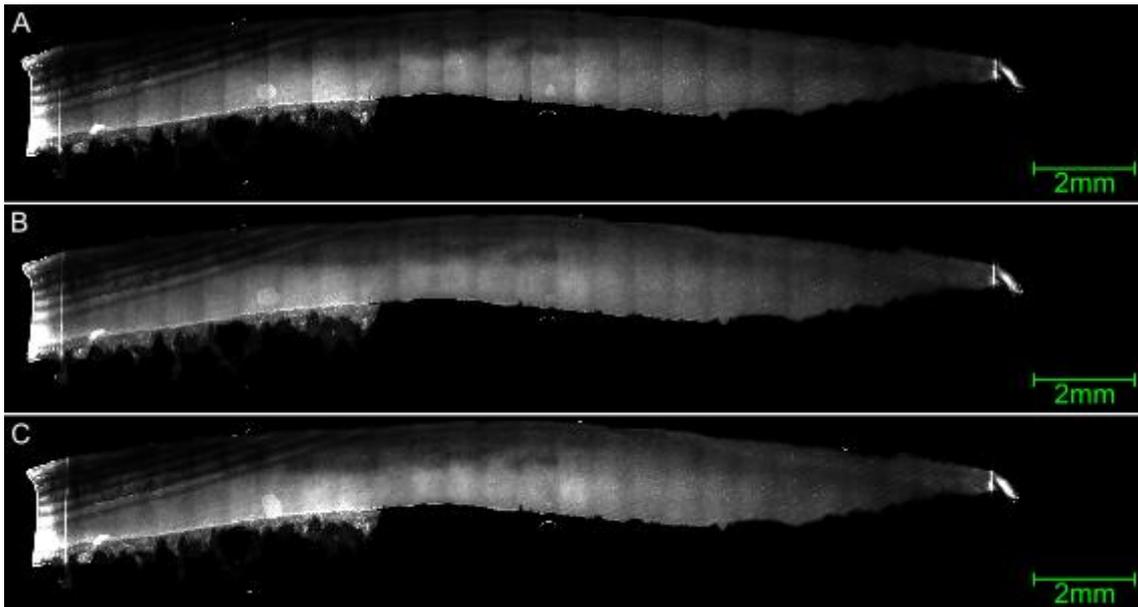


Abbildung 6: Fluoreszierende Übersichtsaufnahme (Col6a3+FITC, Kollagen VI = weiß) mit 5%iger Überlappung (A), 15%iger Überlappung (B) und 20%iger Überlappung (C).

Es konnte festgestellt werden, dass die besten Aufnahmen mit einer Überlappung von 20 % angefertigt werden konnten.

Nachfolgend in Abbildung 7 und Abbildung 8 sind beispielhafte Übersichtsaufnahmen aus der Seitansicht dargestellt. Abbildung 7C und Abbildung 8C zeigen neben klassischen Chondronen auch stabförmige Aneinanderreihungen von Chondrozyten, die Einzelstrings (pSS).

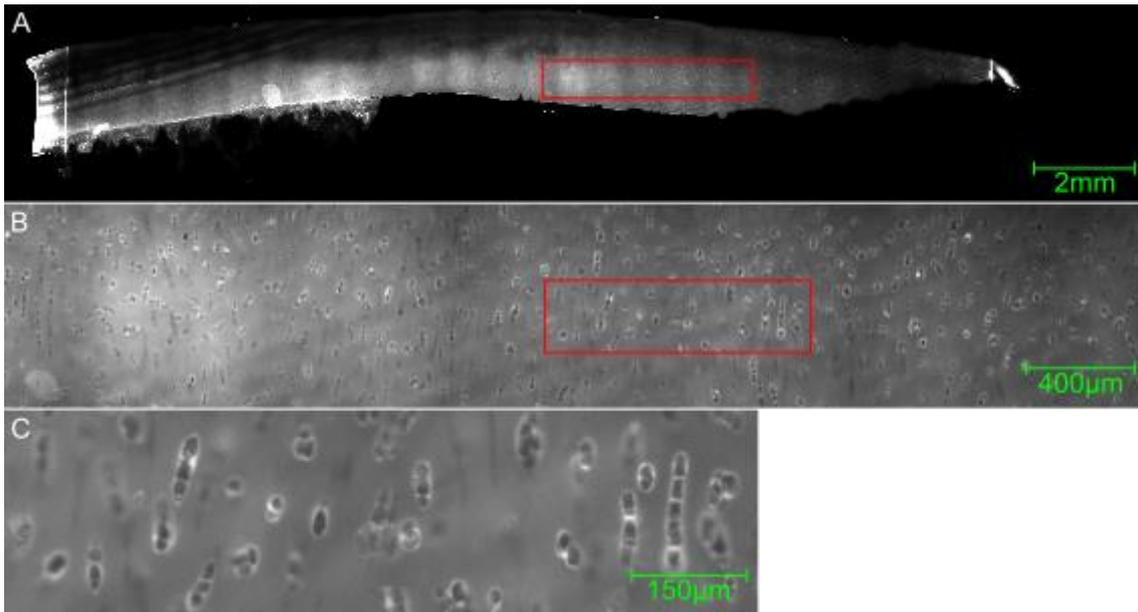


Abbildung 7: Fluoreszierende Übersichtsaufnahme (Col6a3+FITC, Kollagen VI = weiß) eines Probendünnschnitts (A) mit vergrößerten Ausschnitten zur Zelldifferenzierung (B+C).

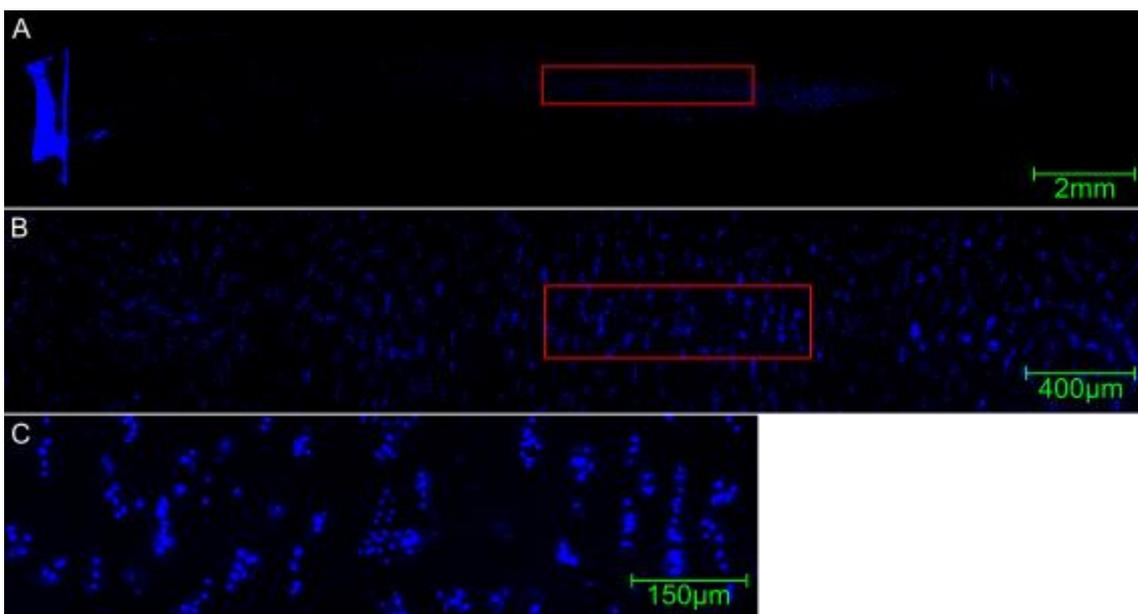


Abbildung 8: Fluoreszierende Übersichtsaufnahme (DAPI, Nuclei = blau) desselben Dünnschnitts aus Abbildung 7 (A) mit vergrößerten Ausschnitten zur Zelldifferenzierung (B+C).

2.2.5.4 Vorläufige zweidimensionale qualitative Analyse

Basierend auf den SCSO, die als proponiertes Korrelat für den entsprechenden Grad der Knorpelschädigung für den Nachweis der OA genutzt wurden, wurden

Kriterien für die Beurteilung der Übersichtsaufnahmen aufgestellt, die Tabelle 8 aufgelistet sind:

Tabelle 8: Auflistung der Kriterien für die mikroskopische Probenevaluation

Kriterium	Probe 1	Probe 2	...	Probe n
Superficialzone (SZ) vorhanden				
Single Strings vorhanden				
Double Strings vorhanden				
Small Clusters vorhanden				
Large Clusters vorhanden				
Diffuse Distribution (pDD) vorhanden				
Freiliegender Knochen vorhanden				

Konnten die Muster in den jeweiligen Dünnschnitten identifiziert werden, so wurde dies in der Tabelle entsprechend vermerkt. Anhand dieser Tabelle wurden einerseits die Proben für die vorläufige radiologische Bildgebung sowie die Proben für die definitive Bildgebung in der μ CT festgelegt. Andererseits wurden auch die Proben evaluiert, die definitiv nicht für die μ CT in Frage kamen und sich somit für die Erprobung der darauffolgenden, unterschiedlichen Dehydratisierungsverfahren sowie der Testung der Kontrastmittelfärbung eigneten. Ebenso wurde festgelegt, welche Proben dehydratisiert und welche Proben in Flüssigkeit gebettet für die μ CT verwendet werden sollten.

2.2.6 Morphologische Grobadjustierung

Die Proben, deren Dünnschnitte die vorausgesetzten Kriterien bei der mikroskopischen Evaluation erfüllten, unterliefen anschließend einer morphologischen Adjustierung. Hierbei wurde, nachdem das Vorhandensein ausreichender Reservecutungen sichergestellt und gegebenenfalls weitere Dünnschnitte angefertigt wurden, die Probe erneut mit einem Stahllineal vermessen und gegebenenfalls auf die berechneten Maße (Tabelle 7) manuell getrimmt. Als Schneidewerkzeug

dienten Kryostatklingen, da es durch deren ausreichend lange Schnittfläche besser umsetzbar war, glatte Schnittkanten zu erzeugen.

Diejenigen Proben, die nicht für die nachfolgenden Dehydratisierungsverfahren ausgewählt wurden, wurden ohne Berücksichtigung eines Reservevolumens direkt auf die Sichtfeldmaße des Computertomografen getrimmt.

2.2.7 Färbung mit Kontrastmittel

Für die μ CT haben fluoreszierende Farbstoffe keine Relevanz. Über die Verwendung von röntgendichten Kontrastmitteln zur besseren Differenzierung der Zellen voneinander sowie von der sie umgebenden EZM in der μ CT, insbesondere bei Anwendung des Absorptionskontrastverfahrens, herrscht in der aktuellen Literatur wie bereits erwähnt kein ausreichender Konsens. In dieser Studie war es das Ziel, beide Optionen gegeneinander auszutesten.

Gängige Praxis zur kontrastreichen Gewebefärbung in der routinemäßigen CT ist beispielsweise die Verwendung iodhaltiger Kontrastmittel. Zur Erfüllung des Studienziels, ergo zur differenzierten Darstellung der SCSO im Absorptionskontrastverfahren der μ CT war eine derartige Anhebung des Zellkontrastes gegenüber der EZM ebenfalls erforderlich. Da die zur Verfügung gestellte Aufnahmezeit am Computertomografen begrenzt war, war es notwendig den Färbestatus der Proben vor Durchführung der μ CT zu prüfen. Somit musste eine hierfür geeignete Methodik etabliert werden. Es wurde daher nach einem Stoff gesucht, der an Strukturen der Chondrozyten bindet, eine erhöhte Röntgendichte aufweist und zusätzlich fluoreszierende Eigenschaften besitzt. Ein solcher Stoff ist Propidiumiodid, welcher regelhaft zur histologischen Fluoreszenzmikroskopie verwendet wird. Durch seine Fähigkeit, in DNS zu interkalieren sowie durch seine erhöhte Röntgendichtigkeit durch das gebundene Iod sollte dieser Farbstoff die Funktionen der zielgerichteten Bindung mit denjenigen eines Kontrastmittels vereinen. Propidiumiodid kann die intakte Zellmembran lebender Zellen nicht passieren. Lediglich die perforierte Membran toter Zellen ermöglicht dem Farbstoff die Zellpenetration. Da in der Studie jedoch kein vitales Gewebe verwendet wurde, stellte diese Eigenschaft kein Problem dar.

Für den Färbeprozess wurden Reaktionsgefäße mit einem Fassungsvermögen von 2 ml verwendet. Bei einer angestrebten Konzentration von 1 μl Propidiumiodid pro 0,20 ml DPBS wurden 10 μl Propidiumiodid in 2 ml DPBS pipettiert. Nach einmaliger Invertierung wurde das Reaktionsgefäß mit Aluminiumfolie umwickelt und für 48 h bei 4 °C gelagert. Die lange Einwirkzeit sollte die Wahrscheinlichkeit der suffizienten Gewebepenetration erhöhen, da die zu färbenden Proben deutlich dicker waren als ein Gewebedünnschnitt. Der UV-Schutz war für den Erhalt der fluoreszierenden Eigenschaft des Propidiumiodid-Farbstoffs notwendig. Anschließend erfolgte ein Waschvorgang mit 5 ml DPBS in Polypropylen-Röhrchen mit einem Fassungsvermögen von 15 ml für eine Dauer von 1 h bei Raumtemperatur auf einem Laborschüttler.

Zur Kontrolle des Färbungsgrades bei der Etablierung des Verfahrens wurden nachträglich Dünnschnitte vom Probenrand sowie aus der Mitte einer anschließend zerteilten Probe angefertigt und unter dem Fluoreszenzmikroskop vergleichend betrachtet. Da es hierfür notwendig war, die Probe zu zerstören, wurden für diese Kontrolle lediglich Proben verwendet, die gemäß Tabelle 8 nicht für die μCT evaluiert wurden. Es zeigte sich, dass durch Anfärbung der Probenblöcke gemäß geschildertem Algorithmus ein ausreichender Färbegrad erreicht werden konnte, um eine erneute Evaluation gemäß Tabelle 8 zu bestehen.

Nicht alle Proben unterlagen diesem Färbeprozess. Somit konnte nach direktem Vergleich der vorläufigen μCT -Aufnahmen nativer und Propidiumiodid-haltiger Proben schlussgefolgert werden, ob und in welchem Ausmaß die kontrastmittelhaltigen Proben eine bessere Zelldifferenzierung ermöglichen.

2.2.8 Dehydratisierung

Die wesentlichen Aufnahmen in dieser Studie erfolgten hardwarebedingt mittels Absorptionskontrast-Technologie, bei welcher der Übergang von Substanzen hoher zu Substanzen niedriger Dichte wie beispielsweise Luft hervorgehoben wird. Hierfür war es notwendig, das Gewebe zu dehydratisieren.

Für die Umsetzung der Dehydratisierung standen zwei Verfahren zur Verfügung: Die alkoholische Dehydratisierung sowie die Lyophilisation, zwei hierfür anerkannte Methoden. Von einer reinen Lufttrocknung wurde zur Gewebeschonung abgesehen.

Auch den Prozess der Dehydratation durchliefen nicht alle Proben, um nach der vorläufigen μ CT Aussagen über die Vor- und Nachteile der jeweiligen Aufbereitungsverfahren treffen zu können.

2.2.8.1 Alkoholische Dehydratisierung

Bei der alkoholischen Dehydratisierung wird das im Gewebe enthaltene Wasser schrittweise durch Alkohole (Ethanol oder Methanol) in aufsteigender Konzentration ersetzt. In der Histologie spricht man von einer aufsteigenden Alkoholreihe. In der Studie wurde der Alkohol Ethanol verwendet und mit DPBS in unterschiedlichen Konzentrationen verdünnt. Für die Alkoholreihe wurden Ethanol-DPBS-Medien mit Konzentrationen von 25, 50, 75, 90 und 95 % Ethanol sowie zweimal 100 % Ethanol hergestellt und als Volumina von jeweils 10 ml in Polypropylen-Röhrchen abgefüllt. Anschließend durchliefen die Proben die alkoholische Dehydratisierung. Beginnend mit der niedrigsten Alkoholkonzentration von 25 %, wurden die Proben nach 6–8 h in das Medium mit der nächsthöheren Alkoholkonzentration gegeben. Zuletzt wurden die Proben zweimalig in Xylol für jeweils 30 min eingelegt.

Nach dem Durchlaufen der Alkohol-Xylol-Reihe wurden die Proben auf Aluminiumfolie gelegt und für 24 h an der Luft bei Zimmertemperatur unter der Abzugshaube getrocknet. Durch den Austausch des im Gewebe enthaltenen Wassers durch Ethanol und Xylol war somit eine schonendere Lufttrocknung möglich.

Es konnte festgestellt werden, dass die getrockneten Proben deutlich an Härte und Steifigkeit zugenommen haben. Für den weiteren Studienverlauf war das deshalb relevant, da die Proben eine natürliche, bogenförmige Krümmung aufwiesen, die durch die Aushärtung während der Trocknung nicht mehr korrigierbar war (Abbildung 9).



Abbildung 9: Beispiel einer Probe mit bogenförmiger Krümmung um eine Achse. Knorpel = konvexe Fläche, subchondraler Knochen = konkave Fläche.

Die stark gekrümmten Proben wichen in diesem morphologischen Zustand deutlich von den vorgeschriebenen Sichtfeldmaßen ab und konnten somit nicht für die Stempelbeladung verwendet werden. Aus diesem Grund musste eine Methode gefunden werden, mit der trotz Härtung der Proben die Sichtfeldmaße weiterhin eingehalten werden konnten. Es wurde deshalb versucht, die Proben vor dem Dehydratisierungsprozess in den gewünschten morphologischen Zustand zu bringen und diesen Zustand während des Trocknungsvorgangs beizubehalten. Hierfür musste eine Schienungsapparatur hergestellt werden.

Die erste Überlegung bestand darin, die Proben gleich in Trinkhalme zu betten und darin zu dehydratisieren. Der Vorteil dieser Methode bestand in der Tatsache, dass für die später folgende Stempelbeladung ebenfalls Trinkhalme als Einbettungsgefäß dienen und man somit sichergehen konnte, dass die vorgegebenen Sichtfeldmaße nicht überschritten wurden. Zwei entscheidende Nachteile ergaben sich allerdings bei diesem Verfahren: Zum einen bot ein Trinkhalm möglicherweise nicht genügend Kontaktfläche zwischen alkoholischer Lösung und Probe, weshalb eine suffiziente Dehydratisierung wahrscheinlich nicht gewährleistet gewesen wäre. Eine Überlegung, die Kontaktfläche durch Bohrungen in den Trinkhalmen zu vergrößern, wurde aus Sorge um eventuell resultierende, fokale Trocknungsdifferenzen abgelehnt. Zum anderen hätte das zu dehydratisierende Gewebe bereits vor dem Trocknungsprozess auf die Sichtfeldmaße zugeschnitten werden müssen, um überhaupt in den Trinkhalm zu passen. Durch die Gewebeschrumpfung während des Trocknungsvorgangs wären die vorgeschriebenen Maße dann allerdings deutlich unterschritten worden.

Eine zweite Überlegung bestand darin, die Proben mittels zweier stabiler Metallstifte sowie mehreren Drahtschlaufen, alternativ kleine Gummis, zu schienen. Eine ausreichende Kontaktfläche für die Alkohollösung war somit gegeben. Allerdings ergab sich hieraus das Problem, dass durch die fokal konzentrierte Druckbelastung durch die Metallstifte eine Schädigung des oberflächlichen Probengewebes nicht auszuschließen gewesen wäre. Weiterhin hätte das Verweilen metallischer Bestandteile in alkoholischer Lösung über größere Zeiträume möglicherweise ungewünschte Reaktionen im Probengewebe auslösen können.

Eine Konstellation, die die geschilderten Probleme zu lösen schien, bestand aus Hartplastikplatten, herkömmlichen Haargummis und zurechtgeschnittenen Pipetten-Filterspitzen (Abbildung 10).



Abbildung 10: Schienungsapparatur für den Dehydratisierungsprozess, bestehend aus zwei Hartplastikplatten (rechteckige, durchsichtige Boden- und Deckplatten), die von je zwei Haargummis (schwarz, vertikal verlaufend) zusammengehalten werden mit dazwischen eingespannter Probe (gelblich) in Seitansicht (A) und Apikalsicht (B).

Die Hartplastikplatten wurden aus leeren DPBS-Flaschen herausgeschnitten und dienten als Schienungsplatten. Die chemischen Eigenschaften des inerten Kunststoffes waren geeignet für den alkoholischen Dehydratisierungsprozess. Die relativ große Kontaktfläche zur Probe konnte das Risiko von Druckschäden am Gewebe minimieren und die ebene Form der Platten gewährleistete einen möglichst großen Freiraum dazwischen, um genügend Kontaktfläche zwischen Probe und alkoholischer Lösung schaffen zu können. Durch Variierung der Plattenbreite

bei unveränderbarer Haargummigröße konnte der Druck der Platten auf die Proben verändert werden. Als geeignete Plattengröße bei Proben von etwa 3 * 3 * 20 mm (Breite * Tiefe * Höhe) ergaben sich Maße von 25 * 18 mm. Die Haargummis dienten als Plattenfixierung, um einen ausreichenden Druck zur Streckung der Proben aufbauen zu können. Auch diese bestanden aus inertem Kunststoff.

Für eine optimale Druckverteilung war eine exakte Positionierung der Probe notwendig (Abbildung 11A). Als Fixierungshilfe dienten hierbei anatomische Pinzetten. Durch die Feuchtigkeit innerhalb der Apparatur und dem daraus resultierenden rutschigen Milieu konnte diese Positionierung allerdings häufig nicht suffizient umgesetzt werden, da bereits minimale Abweichungen zur Dislokation der Probe führten (Abbildung 11B). Durch das Wegrutschen der Probe zur Seite kippen die Plastikplatten zur gegenüberliegenden Seite, wodurch eine Fehlbelastung auf die Probenkante entstand (Abbildung 11C+D). Diese Fehlbelastung hätte neben Gewebeschäden die Probe zum Umkippen bringen können, wodurch die komplette Schienung insuffizient geworden wäre. Eine diagonale Positionierung der Probe von Plattenecke zu Plattenecke konnte das Wegrutschen teilweise verhindern. Für die endgültige Stabilität musste in einigen Fällen jedoch ein Objekt in den Freiräumen zwischen den Platten positioniert werden. Hierfür wurden die auf etwa 3–5 mm zugeschnittenen 10- μ l-Pipetten-Filterspitzen verwendet. Durch geschickte Positionierung konnten sie zwischen Probe und Haargummi geklemmt werden, wodurch die Probe an Ort und Stelle fixiert wurde. Gleichzeitig verhinderten sie das Abkippen der Plastikplatten (Abbildung 11E, Abbildung 12: Roter Kreis).

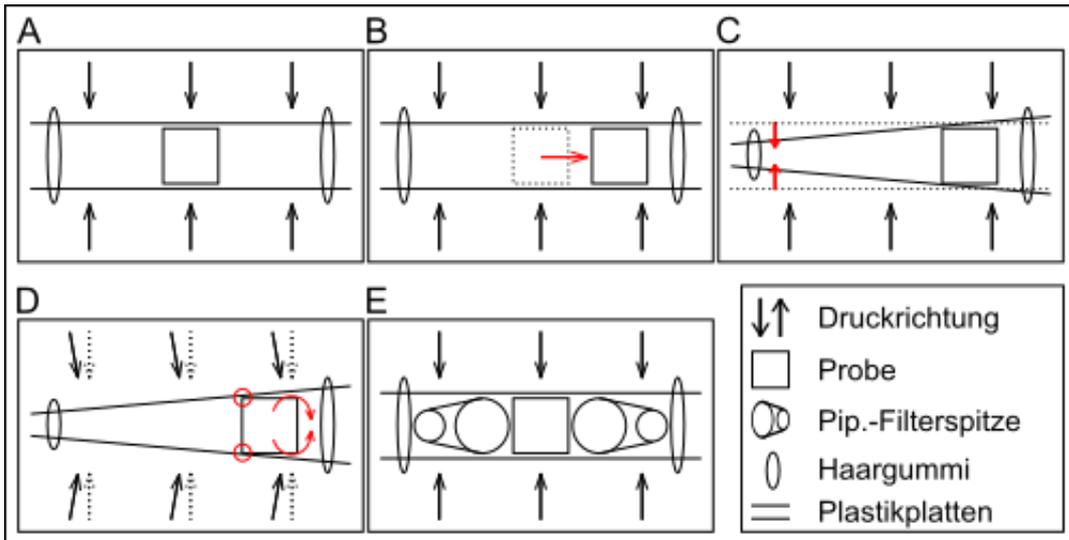


Abbildung 11: Bildfolge zur Darstellung der Problematik und Lösungsfindung bei der korrekten Positionierung der Probe in der Schienungsapparatur.



Abbildung 12: Proben im Dehydratisierungsprozess in einer Zellkulturplatte (6-Well); Teilweise unter Verwendung der vorherig beschriebenen Pipetten-Filterspitzen (rote Markierung).

Aufgrund der durch die Schienungsapparatur bedingten Herabsetzung der Kontaktfläche zwischen der alkoholischen Lösung und den Proben wurde die Verweildauer der Proben in den jeweiligen Lösungen unterschiedlicher

Alkoholkonzentration auf zwölf bis 14 h verlängert. Weiterhin wurden die Proben auf einen Laborschüttler positioniert, um die Gewebepenetration durch die alkoholische Lösung zu fördern.

Die Annahme, dass sich das Gewebe beim Aushärtungsprozess in seiner Struktur stabilisiert und somit seine veränderte Morphologie nach der Trocknung selbstständig beibehält, konnte dann bestätigt werden (Abbildung 13).



Abbildung 13: Probe (gelblich) auf einem Objektträger liegend nach dem Dehydratisierungsprozess unter Verwendung einer Schienungsapparatur.

Es konnte festgestellt werden, dass das Gewebe während der darauffolgenden, 24-h-Lufttrocknung wieder eine leichte Krümmung aufwies. Das Ausmaß dieser Krümmung entsprach jedoch nicht annähernd dem Ausmaß der Probe im ursprünglichen Zustand und die Proben wiesen eine deutlich höhere Flexibilität auf, sodass die Sichtfeldmaße noch gewährleistet werden konnten. Paradoxerweise krümmten sich die Proben nach der Dehydratisierung nicht wie ursprünglich, sodass der subchondrale Knochen die konkave Fläche darstellte. Stattdessen krümmten sich die Proben in Richtung der chondralen Fläche, sodass der knöchernen Probenteil daraufhin die konvexe Fläche darstellte (Abbildung 14), was am ehesten auf den ausgeprägteren Flüssigkeitsverlust des Knorpels im Vergleich zum Knochen zurückzuführen ist.



Abbildung 14: Dehydratisierte Probe mit paradoxem Krümmungseffekt entgegen der ursprünglichen Krümmungsrichtung. Knorpel = konkave Fläche, subchondraler Knochen = konvexe Fläche.

Die Lagerung der getrockneten Proben erfolgte in Reaktionsgefäßen mit einem Volumen von 2 ml. Sowohl zum Schutz vor Rehydratisierung, als auch als Indikator für ansteigende Luftfeuchtigkeit im Reaktionsgefäß wurde Trocknungsmittel-Granula hinzugegeben.

2.2.8.2 Lyophilisation

Einen zweiten Ansatz zur Entwässerung der Proben stellte die Gefriertrocknung, auch Lyophilisation genannt, dar. Bei diesem Verfahren wird sich die Eigenschaft des Wassers zunutze gemacht, auch im gefrorenen Zustand einen ausreichend hohen Dampfdruck zu besitzen, um nach Erzeugung eines Vakuums direkt vom festen in einen gasförmigen Aggregatzustand überzugehen. Dieser Vorgang wird als Sublimation bezeichnet. Durch die Aussparung der flüssigen Phase kann das Gewebe besonders schonend getrocknet werden. Für den Prozess der Sublimation muss das Gewebe tiefgefroren werden, um anschließend unter Erzeugung eines Vakuums dehydratisiert werden zu können. Diese Arbeitsschritte übernimmt ein Lyophilisator.

In der Studie wurde kein herkömmlicher Lyophilisator, sondern eine sogenannte Vakuum-Konzentrationszentrifuge verwendet. Das Prinzip der Dehydratisierung ähnelt dem der Lyophilisation. Hierzu wurden die Proben in für die Zentrifuge geeignete Reaktionsgefäße gegeben. Der Deckel der Reaktionsgefäße wurde mit einer Schere entfernt, um den Trocknungsprozess nicht zu behindern.

Nach dem Trocknungsprozess konnten bereits makroskopisch deutliche morphologische Verformungen an den Proben festgestellt werden, die eine Verwendung für die μ CT mit den gegebenen Sichtfeldmaßen zweifelhaft erscheinen ließen (Abbildung 15).



Abbildung 15: Probe nach Dehydratisierung mittels Vakuum-Konzentrationszentrifuge mit morphologischen Torsionen um zwei Achsen.

Die Lagerung der lyophilisierten Proben erfolgte in Reaktionsgefäßen mit einem Volumen von 2 ml. Ebenso wie bei den alkoholisch dehydratisierten Proben wurde den Reaktionsgefäßen Trocknungsmittel-Granula hinzugegeben.

2.2.9 Morphologische Feinadjustierung

Vor der Beladung der Stempel für die μ CT mussten die Proben einer letzten morphologischen Adjustierung unterzogen werden, um den Vorgaben für den Tomografen zu entsprechen. Da keine weiteren Bearbeitungsschritte mehr folgten, die Einfluss auf die Probenmorphologie hätten nehmen können, konnten die Proben nun auf die endgültigen Maße präpariert werden. Hierfür wurden, ebenso wie bei der ersten morphologischen Adjustierung, ungebrauchte Kryostatklingen verwendet.

Während sich die in DPBS eingelegten Proben problemlos und millimetergenau bearbeiten ließen, stellte die Bearbeitung der dehydratisierten Proben eine besondere Herausforderung dar. Durch ihre erhöhte Festigkeit war eine präzise Schnittführung bei den durch alkoholische Dehydratisierung getrockneten Proben deutlich erschwert. Die lyophilisierten Proben wiesen eine derartige Festigkeit auf, dass die Bearbeitung mit der Kryostatklinge unmöglich war. Um die

Proben dennoch auf die erforderlichen Sichtfeldmaße adjustieren zu können, kamen Schleifsteine und Schleifpapier verschiedener Körnung zum Einsatz. Bereits lichtmikroskopisch waren jedoch deutliche Schleifartefakte festzustellen, weshalb die Proben nochmals einem Poliervorgang unterzogen wurden. Hierzu wurde eine mit einem Polieraufsatz ausgestattete Bohrmaschine verwendet.

2.2.10 Anfertigung der SR- μ CT-Aufnahmen

Die radiologischen SR- μ CT-Aufnahmen erfolgten an der Beamline „IBL P05“ des Deutschen Elektronen-Synchrotron (DESY) in Hamburg, Deutschland, betrieben durch das Helmholtz Zentrum Geesthacht.

2.2.10.1 Beladung der Stempel

Für die Messung im SR- μ CT mussten die Proben auf Stempel aufgebracht werden. Die beladenen Stempel konnten in einer dafür vorgesehenen Halterung im Tomografen positioniert werden und dienten dann als Rotationsplattform für die auf ihnen positionierten Proben.



Abbildung 16: Unbeladener μ CT-Stempel.

Ein solcher, 3 cm hoher stählerner Stempel (Abbildung 16) bestand aus einer 0,90 cm hohen Andockstelle für den Tomografen, einem 1,30 cm hohen Mittelstück sowie einer 0,80 cm hohen Beladesäule für die Proben.

Für die Beladung der Stempel bestanden keine vorgeschriebenen Richtlinien. Die Einhaltung der festgelegten Sichtfeldmaße lag in der Verantwortung des Studienleiters.

Prinzipiell musste zwischen zwei Möglichkeiten der Probenanbringung auf dem Stempel unterschieden werden. Die erste Möglichkeit bestand darin, die Probe mithilfe eines Fixierungsmittels direkt am Stempel zu fixieren. Allerdings ergaben sich bei dieser Option einige Nachteile. Zum einen musste das Fixierungsmittel direkten Kontakt mit der Probe haben. Durch die Tatsache, dass das Fixierungsmittel eine ausreichend hohe Festigkeit aufweisen musste, um die stabile Verbindung zwischen Stempel und Probe sowie eine starre Fixierung zur dauerhaften Einhaltung der Sichtfeldmaße gewährleisten zu können, mussten Fixierungsmittel wie Paraffin, die einfach und ohne Zufügung von Gewebeschäden wieder gelöst werden können, ausgeschlossen werden. Somit hätte ein Fixierungsmittel Verwendung finden müssen, welches irreversibel an der Probe haftet, woraus resultiert hätte, dass die Proben für die der μ CT folgenden Rehydratisierungs- und Histologieverfahren unbrauchbar gewesen wären. Weiterhin wäre die Korrektur eines unpräzise beladenen Stempels nicht möglich gewesen, ohne die Probe erheblich zu schädigen. Ebenfalls problematisch wäre die Beladung mit einer feucht zu haltenden Probe gewesen, da der direkte Kontakt mit der Umgebungsluft das Gewebe zwangsläufig hätte austrocknen lassen.

Die zweite Möglichkeit bestand in der Verwendung eines Hohlkörpers, der durch seine morphologische Struktur der Beladesäule des Stempels übergestülpt und somit, durch eventuell additive Verwendung eines Fixierungsmittels, am Stempel fixiert werden konnte. Dadurch erfüllte er zwei wichtige Funktionen. Auf der einen Seite diente der Hohlkörper als Adapter zwischen Stempel und Probe, wodurch selbst unter Verwendung eines Fixierungsmittels das Probengewebe nicht geschädigt wurde und somit für weitere Bearbeitungsschritte brauchbar blieb. Ebenfalls konnte ein unpräzise beladener Stempel ohne Beeinträchtigung der Probe korrigiert werden, da lediglich der Hohlkörper ersetzt werden musste. Auf der anderen Seite diente der Hohlkörper als Hüllgefäß für die Proben, was sowohl eine unkomplizierte Anbringung der Probe am Stempel, als auch das Anbringen feucht zu haltender, in Flüssigkeit eingelegter Proben gewährleistete.

Als geeignete Hohlkörper erwiesen sich Trinkhalme aus Kunststoff. Die Gefahr der Artefaktgenerierung bei der μ CT war hiermit gering. Für die Aufnahmen

wurden Trinkhalme mit 3,50 mm Außendurchmesser verwendet. Um die Gefahr des Abweichens von den vorgegebenen Sichtfeldmaßen durch unpräzise Stempelbelastungen zu minimieren musste darauf geachtet werden, die Trinkhalme bis auf die notwendige Mindestlänge zu kürzen. Hierfür wurde zunächst mittels einer Präzisions-Schieblehre die Eindringtiefe des Stempels in einen Trinkhalm gemessen und unter Berücksichtigung eines zusätzlichen Raumes für eventuell verwendetes Fixierungsmittel von etwa 0,30 cm mittels eines Folienstiftes auf dem Trinkhalm gekennzeichnet. Anschließend wurde die ebenfalls mittels einer Präzisions-Schieblehre gemessene Probenhöhe der Markierung zuaddiert und erneut eine Markierung auf dem Trinkhalm gesetzt. Dieser zweiten Markierung folgte nach weiteren 0,50 cm eine dritte Markierung. Diese letzten 0,50 cm dienten als Reservevolumen für das Abdichtungsmittel, welches eine geschlossene Kammer innerhalb des Trinkhalmes gewährleistete, wodurch sowohl die sichere Einbettung der feucht zu haltenden Proben in Flüssigkeit, als auch die Trockenlagerung dehydratisierter Proben ermöglicht wurde. An der dritten Markierung wurde der Trinkhalm mittels einer Kryostatklinge abgeschnitten. Auf die Verwendung einer Schere wurde verzichtet, da durch die erhöhte Druckbelastung die Trinkhalme deutlich verformt wurden. Nachfolgend wurde der Trinkhalm der Beladesäule des Stempels übergestülpt. Da das alleinige Überstülpen des Trinkhalms keine stabile Verankerung gewährleistete, musste zusätzlich ein Fixierungsmittel verwendet werden. Paraffin als Fixierungsmittel erwies sich aufgrund seiner niedrigen Fixierungsstärke und seiner Wärmeempfindlichkeit als nicht geeignet, weshalb als Fixierungsmittel ein Klebstoff aus einer Heißklebepistole verwendet wurde. Dieser Klebstoff wurde vor dem Überstülpen des Trinkhalmes auf dem Stempel aufgebracht.

Ferner wurde die Beladestelle des Stempels durch vorherige, mehrere Sekunden andauernde Berührung mit der heißen Metallspitze der Heißklebepistole konduktiv erhitzt, wodurch der anschließend aufgebrauchte Klebstoff länger in seiner verformbaren Phase verweilte. Dadurch ergab sich ein vergrößertes Zeitfenster zur korrekten Ausrichtung des Trinkhalms. Auf das Erhitzen durch eine Flamme wurde aufgrund der Entwicklung störender Rußpartikel sowie der zeitlichen Verzögerung durch den Wechsel der Instrumente verzichtet. Die dem Stempel

anliegende Öffnung des Trinkhalms wurde ebenfalls vorher mittels Heißklebepistole erhitzt, um durch Druckausübung des Trinkhalms auf den Stempel die Trinkhalmkanten glätten und somit eine Ausrichtung im Lot gewährleisten zu können.

Zur Überprüfung der korrekten Ausrichtung des Trinkhalms wurde sein Verhalten in der μ CT simuliert, indem der Stempel vor seiner Beladung in eine Bohrmaschine eingespannt und unmittelbar nach der Beladung rotiert wurde. Durch die Rotation konnten Abweichungen aus dem Lot durch Beobachten aus der Top-Down- sowie Seitansicht detektiert und durch behutsames Zurechtrücken während der Rotation behoben werden. Aufgrund der weißen Farbe der Trinkhalme wurde zur Kontrasterhöhung bei der Beobachtung ein dunkler Hintergrund gewählt, um Auslenkungen deutlicher erkennen zu können. Es musste dabei auf das Zeitfenster bis zum Aushärten des Klebstoffes geachtet werden. Weiterhin musste sichergestellt werden, dass bereits der unbeladene Stempel in der Bohrmaschine im Lot stand.

Anschließend wurde bei korrektem Sitz des Trinkhalms die Probe behutsam mittels eines Inbusschlüssels in den Trinkhalm geschoben. Daraufhin wurde der Trinkhalm durch Befüllen mit Klebstoff aus der Heißklebepistole versiegelt. Bei feucht zu haltenden Proben wurde vorher mittels passender Pipette eine ausreichende Menge an DPBS in das Trinkhalmlumen gegeben. Abbildung 17A zeigt einen erfolgreich beladenen μ CT-Stempel.

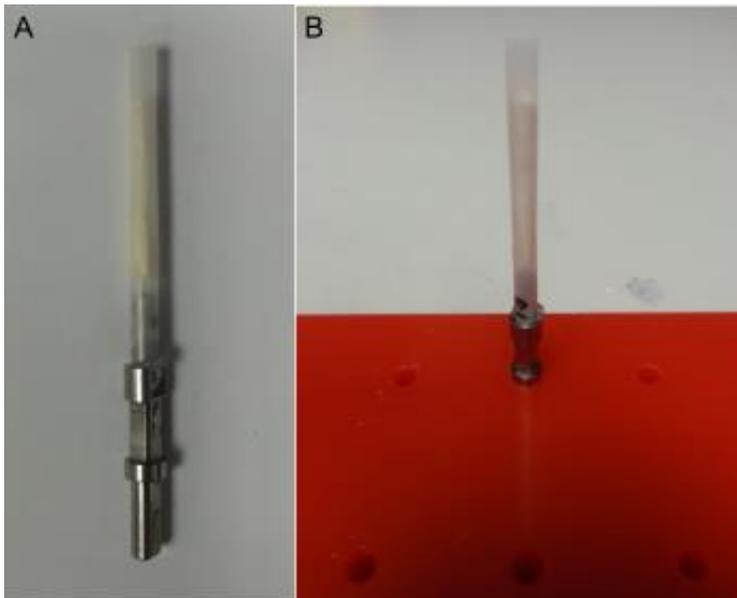


Abbildung 17: Beispiel eines mit in dem Trinkhalm mit der Knorpelprobe beladenen μ CT-Stempels (A) sowie dessen optimale Lagerung in einer dafür vorgesehenen Halterung (B).

Die Lagerung der beladenen Stempel erfolgte in einer dafür vorgesehenen Halterung (Abbildung 17B) in einem luft- und temperaturregulierten Experimentierkasten für zumindest eine Stunde zu Akklimatisierungszwecken. Durch die Lagerung in senkrechter Ausrichtung konnte weitestgehend vermieden werden, dass das Eigengewicht der Proben die Ausrichtung der Trinkhalme auf Dauer beeinflusste.

2.2.10.2 Positionierung und Ausrichtung der Stempel

Unmittelbar vor der Optik des Kameraturms war ein etwa 100 μ m dicker CdWO₄-Kristall montiert. Sichtbares Licht wurde, kontrolliert durch entsprechend adjustierte Spiegelsysteme, in eine CCD-Kamera (EHD SC-9000/Kodak KAF 09000 Chip) mit einer Pixelgröße von 12 * 12 Quadrat-Mikrometer (μ m²) gesteuert. Durch Verwendung von Mikroskop-Optiken konnte eine 5-, 10-, 20 und 40-fache Bildvergrößerung erreicht werden. In dieser Studie wurde eine 10-fache Vergrößerung gewählt, woraus die bereits erläuterten Sichtfeldmaße von 3,70 * 3,70 μ m² mit einer Strahlhöhe von etwa 2 mm resultierten. Der Abstand zwischen Probe und Detektor, die sogenannte Sample-Detector-Distance (SDD) betrug für die Hauptmessungen 20 mm. Zur Minimierung der Phaseneffekte wurde ein Entfritter installiert.^[1]

Die Positionierung der beladenen Stempel in vertikaler Ausrichtung erfolgte auf einer dafür vorgesehenen Hochpräzisions-Plattform. Die Feinadjustierung der Stempelausrichtung erfolgte anschließend computergesteuert. Die Plattform als Ganzes konnte somit noch in x-, y- und z-Achse positioniert werden. Um die exakten Sichtfeldmaße und etwaige kleinste Abweichungen der vertikalen Stellung zu korrigieren, konnte der Stempel selbst mittels Piezokristallen angesteuert und entsprechend ins Lot gekippt werden.

2.2.10.3 Programmierung des Computertomografen

Sowohl die Ausrichtung des Stempels, als auch die Durchführung der Messung erfolgte in Form eines prozeduralen Kommandoskripts mittels speziell hierfür konzipierter Syntax.

Neben der Ausrichtung des Stempels gab es einige Parameter, die vor Beginn der Messung festgelegt werden mussten, da sie grundlegend die Messresultate beeinflussten. Die Wahl des geeigneten Messverfahrens war der erste Schritt, den es probenspezifisch festzulegen galt. Während der Hauptzeit der Studierendurchführung war die zur Verfügung stehende Methode das Absorptionskontrastverfahren, welches bereits in früheren Studien auf Knorpelgewebe eine hochauflösende Darstellung auf zellulärer Ebene sogar ohne Verwendung von Kontrastmittel beweisen konnte^[57]. Für die Anfertigung der Aufnahmen war es daher nötig, die Proben zu dehydratisieren.

Im weiteren Studienverlauf war es hardwarebedingt möglich, am DESY auf die Phasenkontrast- μ CT zuzugreifen, wodurch von deren Vorteilen bei der Darstellung von Verbindungen niedriger Kernladungszahl, ergo Stoffen mit hohem Wasserstoffanteil, profitiert werden konnte. Die Überlegung war es, das Risiko möglicher Veränderungen der Größenverhältnisse einzelner zellulärer und extrazellulärer Bestandteile zueinander, wie sie durch den Dehydratisierungsprozess möglich sind sowie das Risiko von Gewebeschädigungen- und Änderungen durch den Dehydratationsprozess zu minimieren.

Nach der Wahl des Messverfahrens mussten diverse weitere Parameter zur Durchführung der Messung festgelegt werden.

Aufgrund der vorgegebenen Sichtfeldmaße war eine in-toto- Messung nicht möglich, weshalb im Skript festgelegt werden musste, wie weit der Stempel nach jeder Messperiode in y-Richtung zu verschieben ist, um die nächste Messperiode beginnen zu können. Diese sogenannte Strahlhöhe betrug durchschnittlich knapp 2 mm. Ein definierter Überschneidungsraum von ungefähr 0,20 mm zwischen zwei Messblöcken war notwendig, um bei der späteren Rekonstruktion der Rohdaten die randständigen Strahlartefakte ohne Datenverlust herausrechnen zu können. Somit ergab sich eine Versatzhöhe von 1,80 mm.

Weiterhin galt es die Strahlenenergie, gemessen in Kiloelektronenvolt (keV), festzulegen. Die Beamline IBL-P05 am DESY ist mit zwei verschiedenen Monochromatoren ausgerüstet, einem Doppelkristall-Monochromator (DCM) sowie einem Doppel-Mehrschichtmonochromator (DMM). In dieser Studie wurde der DCM genutzt, wodurch Energien von 5 bis 50 keV mit einem Spread von 10 bis 4 möglich waren.^[1]

Ebenfalls musste die Belichtungszeit definiert werden. Sie lag zwischen 200 und 1800 Millisekunden (ms).

Die kontrastreichsten und somit eindeutigsten Resultate konnten bei Energien von 12 keV mit einer Belichtungszeit von 250 ms festgestellt werden.

Anhand der Winkelgradzahl konnte eingestellt werden, mit welcher Frequenz pro vollständige Drehung der Probe belichtet wurde. Diese lag bei den durchgeführten Messungen zwischen 900 und 1200 Winkelgraden für 180°.

Aus den beschriebenen Parametern konnte computergestützt über einen integrierten Algorithmus die effektive Pixelgröße ermittelt werden. Diese war für spätere Referenzierungen und Bestimmungen von Größenverhältnissen im rekonstruierten Datensatz obligat.

2.2.10.4 Durchführung der Messungen

Nachdem die Proben auf dem Stempel im Tomografen positioniert und die genannten Parameter in das Software-Skript eingegeben worden waren, konnte die

Aufnahme initiiert werden. In y-Richtung erfolgten konsekutive Einzelaufnahmen, die nach einer Flat Field-Korrektur software-gestützt über gefilterte Rückprojektion (Filtered Back-Projection, FBP) mittels eines Binnings von 2 zu zweidimensionalen Schnittbildern rekonstruiert und als „Spectral Library“-Dateien (SLI) auf internen Servern des DESY abgespeichert wurden. Bei den festgelegten Probengrößen ergaben sich somit zwischen 9000 und 10.000 Schnittbilder mit einer exakten Dateigröße von je 9.121 Kilobyte (KB). Die Gesamtdatengröße einer digitalisierten, unbearbeiteten Probe betrug somit etwa 85 Gigabyte (GB).^[1]

Die Rohdaten wurden nach Abschluss der Messungen auf eine portable, externe Festplatte des Typs „Hard Disk Drive“ (HDD) mit einer Speicherkapazität von 4 Terabyte (TB) kopiert.

2.2.11 Aufbereitung der μ CT-Rohdaten

Für die weitere Bearbeitung der Aufnahmen mithilfe professioneller Segmentationssoftware waren zwei vorangehende Schritte notwendig: Die Konvertierung der Rohdaten in ein kompatibles Dateiformat sowie die Reduktion der Datensatzgröße. Für diese Arbeitsschritte wurde die Software „Fiji“ verwendet^[62].

2.2.11.1 Konvertierung der Schnittbilder

Zur Konvertierung der SLI-Dateien erfolgte deren Einlesen in Fiji. Aufgrund der Möglichkeit der Stapelverarbeitung von SLI-Dateien konnten diese kumulativ eingelesen und als zusammenhängendes Objekt erkannt werden. Die Konvertierung erfolgte in das zweidimensionale (2D) Dateiformat „Tagged Image File Format (TIFF/TIF)“, welches stapelverarbeitungsfähig und unter Erhalt der Referenzierung eine verlustarme Konvertierung hochauflösender und komplexer Bilddateien gewährleistet. Die hierbei erstellten „TIF“-Dateien boten eine den „SLI“-Dateien entsprechende Auflösung von 32 Bit, was einer Diskriminierungsmöglichkeit von 2^{32} Graustufen entspricht.^[1]

2.2.11.2 Reduktion der Datensatzgröße

Die nach der Konvertierung unveränderte Gesamtdatensatzgröße pro Probe von etwa 85 GB verhinderte hardwarebedingt die weitere Bearbeitung der Aufnahmen, da selbst der leistungsfähigste, in Tübingen zur Verfügung stehende Computer lediglich eine maximale Arbeitsspeicherkapazität von 64 GB aufbringen konnte. Eine Reduktion der Datensatzgröße war somit zwingend erforderlich. Diese Reduktion konnte durch Herabsetzen der Auflösung auf 8 Bit erreicht werden, wodurch sich die Datensatzgröße bereits deutlich reduzieren ließ. Makroskopische Vergleiche einzelner Schnittbilder vor und nach der Reduktion konnten keine relevanten Informationseinbußen für die Fragestellung aufdecken.^[1]

In einem nachfolgenden Arbeitsschritt erfolgte, ebenfalls mithilfe der Software Fiji, das Zuschneiden des Datensatzes zur weiteren Datensatzgrößenreduktion. Hierbei wurden redundante Schnittbilder ohne Informationsgehalt am Anfang und am Ende des Stapels entfernt sowie aus den verbleibenden Schnittbildern redundante Bereiche außerhalb des Trinkhalmes mithilfe der integrierten „Crop“-Funktion herausgeschnitten.

Der resultierende Datensatz wurde daraufhin erneut in Form von „TIF“-Einzelbilddateien abgespeichert. Eine totale Reduktion der Datensatzgröße auf etwa 20 GB konnte somit erreicht werden.

Die weitere Bearbeitung der Aufnahmen erfolgte weitestgehend mithilfe der Bildbearbeitungssoftware „Amira 6.0“, einem Pendant zur am DESY verwendeten Software „Avizo Lite 9.0“ desselben Herstellers, am Tübinger Institute of Evolution and Ecology unter der Leitung von Assistant professor Herr Dr. Stefan Fischer.

2.2.11.3 Import und Vorbereitung der Datensätze

Beim Einlesen der Datensätze in Amira erfolgte in der Importmaske der Software eine Referenzierung, um bei späteren Skalierungen die korrekten Messwerte zu erhalten. Hierfür war es notwendig, die sogenannte „effektive Pixelgröße“ zu kennen, die sich aus den Messbedingungen am DESY ergab und auf acht Nachkommastellen genau angegeben wurde. Diese effektive Pixelgröße betrug gerundet

durchschnittlich etwa 0,0013 mm. Bei einem Binning von 2 während der Aufnahmenrekonstruktion entsprach die resultierende Voxelgröße gerundet etwa 0,0026 mm in alle drei Raumrichtungen.

Im nächsten Schritt wurde der in den Aufnahmen abgebildete Trinkhalm entfernt. Hierzu wurde zunächst zur Kantendetektierung mit der „Threshold“-Funktion der Kontrast entsprechend eingestellt. Anschließend wurde mit der „Path“-Funktion der innere Bereich des Trinkhalms selektiert. Diese Prozedur wurde alle 100 bis 200 Schnittbilder wiederholt, um möglichst genau den Verlauf des Trinkhalms zu erfassen. Anschließend wurden die dazwischenliegenden Bereiche über die „Interpolationsfunktion“ automatisch selektiert. Um etwaige Trinkhalmeinschlüsse beim Interpolieren zu detektieren, wurde der selektierte Block noch einmal durchgesehen. Wurden Trinkhalmreste im selektierten Bereich erfasst, so musste über die „Shrink“-Funktion der komplette Block geschrumpft werden, was gerade bei jenen, den Trinkhalm tangierenden Probenkanten zu vernachlässigbaren Dateneinbußen führte. Frühere Versuche der Bearbeitung mithilfe des Fiji-Plugins „TrackEM2“ zeigten, dass der einzige Vorteil dieses Programmes die Möglichkeit der Angabe eines spezifischen Schrumpffaktors war. Aufgrund des erheblichen Mehraufwandes wurde auf dieses Verfahren allerdings verzichtet. Der selektierte Bereich konnte anschließend in einem ersten Label gespeichert werden.

Mithilfe der „Arithmetic“-Funktion konnte dieses Label aus dem ursprünglichen Datensatz extrahiert werden. Die allgemeine Syntax dieses Befehls lautete:

$$(B == x) * A + (B != y)$$

wobei ‚A‘ für die Datensatz-Source steht und ‚B‘ für das jeweilige Label, ‚x‘ stellt die Nummer des Labels dar und ‚y‘ die Nummer des Labels, welches ausgeschlossen werden sollte. Dementsprechend mussten die Funktionseinstellungen für „Input A“ und „Input B“ entsprechend referenziert werden. Das vorbestehende Label „Exterior“ war vorbelegt mit der Ziffer 0. Um nun den segmentierten Bereich aus dem umgebenden „Exterior“ extrahieren zu können, musste obige Syntax entsprechend korrigiert werden:

$$(B == 1) * A + (B != 0)$$

Das Resultat dieser Berechnung konnte als neuer Datensatz im Dateiformat „TIF“ abgespeichert werden. Die hierdurch generierten Einzeldatensätze konnten als neues Projekt zur später folgenden, qualitativen 3D-Analyse in Amira importiert werden.

2.2.12 Mikroskopische Reevaluation

Um bei der später folgenden, dreidimensionalen Analyse an die bisherigen histologischen Forschungsergebnisse anknüpfen und die beschriebenen SCSO wiederfinden zu können war es das Bestreben, simultan die Proben histologisch erneut aufzuarbeiten. Zwar hätten hierfür auch die bereits gewonnenen Dünnschnitte verwendet werden können, jedoch wäre die Aussagekraft der Daten schwächer gewesen, da nicht dasselbe Gewebe miteinander verglichen worden wäre. Weiterhin war dieser Schritt notwendig, um histologisch das Gewebe vor und nach der De- und Rehydratisierung zu vergleichen und etwaige Gewebeschädigungen oder morphologische Veränderungen aufzudecken.

Anschließend erfolgte die en-bloc-Mikroskopie aus der Apikalsicht zur Vervollständigung der qualitativen histologischen Analyse des Knorpels. Eine quantitative 2D-Analyse sollte daraufhin das Vorhandensein der Degenerationszonen statistisch bestätigen.

2.2.12.1 Rehydratisierung

Für die nachfolgenden histologischen Verfahren war es notwendig, die bei der μ CT verwendeten dehydratisierten Proben zu rehydratisieren. Hierfür wurde, nach demselben Prinzip wie bei der Dehydratisierung, zur Gewebeschonung eine stufenweise Rehydratisierung durch eine absteigende Alkoholreihe durchgeführt. Es wurden dieselben Konzentrationen der Alkohol-DPBS-Medien wie bei der Dehydratisierung verwendet, lediglich in umgekehrter Reihenfolge. Auch die Verweildauer der Proben in den jeweiligen Medien sowie die Volumina der einzelnen Medien pro Polypropylen-Röhrchen wurden nicht verändert. Es konnte

festgestellt werden, dass die rehydratisierten Proben wieder ihren ursprünglichen Krümmungszustand annahmen.

Die rehydratisierten Proben wurden in DPBS eingelegt bei 4 °C gelagert.

2.2.12.2 Dünnschnittgewinnung

Für die Gewinnung der neuen Dünnschnitte wurde nach bereits erläuterten Prinzip vorgegangen und mithilfe eines Kryostats Dünnschnitte aus der Seitansicht von 70 µm Dicke angefertigt. Zur Sicherstellung einer für die nachfolgende en-bloc-Mikroskopie in der Apikalsicht ausreichenden Restbreite der Probenblöcke konnte nur eine Anzahl von drei bis fünf Dünnschnitten angefertigt werden.

Die Dünnschnitte wurden in DPBS eingelegt bei 4 °C gelagert.

2.2.12.3 Morphologische Adjustierung

Für die en-bloc-Mikroskopie der apikalen Probenschicht mussten die rehydratisierten Proben erneut morphologisch korrigiert werden, da sich bei einer vorläufigen mikroskopischen Aufnahme herausstellte, dass sich lediglich die Probenbereiche darstellen ließen, die eine Tiefe von 1 mm oder geringer aufwiesen. Die apikale Schicht von Probenbereichen mit einer größeren Tiefe ließ sich mikroskopisch nicht darstellen.

Für die Adjustierung wurde der Knorpel auf der Seite liegend mit einer anatomischen Pinzette auf einem kontrastreichen Untergrund fixiert und mithilfe einer Skalpellklinge präpariert. Es musste, vom subchondralen Knochen ausgehend, die Probe bis auf eine verbleibend Resttiefe von 1 mm oder weniger ausgedünnt werden, ohne dabei die oberste Probenschicht zu kompromittieren.

Die adjustierten Proben wurden in DPBS eingebettet bei 4 °C gelagert.

2.2.12.4 Färbung mit 4'6-Diamidin-2-phenylindol

Für die abschließende Mikroskopie wurde zur Hervorhebung der Zellen erneut eine Färbung mittels DAPI durchgeführt. Da dieser Farbstoff eine andere Bindungsstelle adressiert als das zuvor auf selbige Proben angewandte

Propidiumiodid, waren keine Signalverluste durch kompetitive Inhibition zu erwarten. Die Emissionsmaxima lagen ebenfalls in unterschiedlichen Bereichen. Bei insgesamt gleicher Zielstruktur wäre jedoch selbst im Falle einer Überlappung diese im Sinne der Fragestellung nicht nachteilig gewesen.

Alle gefärbten Dünnschnitte und Proben wurden unter Schutz vor UV-Strahlung in DPBS eingebettet bei 4 °C gelagert.

2.2.12.4.1 Färbung der Dünnschnitte

Von den neu gewonnenen Dünnschnitten der rehydratisierten Proben wurden jeweils zwei Dünnschnitte mit DAPI angefärbt.

2.2.12.4.2 En-bloc-Färbung der rehydratisierten Proben

Für die en-bloc-Mikroskopie war es ebenfalls notwendig, die Zellen im rehydratisierten Gewebeverband fluoreszierend zu markieren, um sie bei den Aufnahmen lokalisieren und differenzieren zu können. Aufgrund der größeren Penetrationsstrecke und des erhöhten Gewebematerials wurden die Menge der Farbstofflösung sowie die Färbedauer angepasst.

2.2.12.5 Anfertigung der Aufnahmen

Die angefärbten Dünnschnitte sowie die angefärbten Probenblöcke konnten abschließend mikroskopisch digitalisiert werden. Hierbei wurde erneut die bereits beschriebene Mosaiktechnik zur Erstellung großer Übersichtsaufnahmen angewandt, wobei jeder Fokuspunkt des Gitternetzes manuell gesetzt und durch Einstellen des korrekten Objektivabstandes scharf gestellt wurde.

2.2.12.5.1 Mosaikanfertigung von Reservedünnschnitten

Die bereits erstellten Übersichtsaufnahmen der Dünnschnitte vor dem Dehydratisierungsprozess zum Zweck der mikroskopischen Evaluation reichten durch das Setzen vereinzelter Fokuspunkte im Gitternetz zur reinen Musteridentifizierung aus. Für komplexe, qualitative sowie quantitative Auswertungen und histologische Vergleiche war es allerdings notwendig, deutlich präzisere Übersichtsaufnahmen zu erstellen, bei denen jeder einzelne Punkt im mikroskopischen Raster vor der Aufnahme manuell und individuell scharf gestellt wurde. Nur dadurch

konnten die komplexen Tiefenunterschiede der Zellen in den Dünnschnitten identifiziert und ausgeglichen werden. Aus diesem Grund war eine erneute Mosaikanfertigung der alten Dünnschnitte erforderlich.

2.2.12.5.2 Mosaikanfertigung neuer Dünnschnitte

In selbiger Weise wurden auch die neu angefertigten Dünnschnitte der rehydratisierten Proben durch Anfertigung einer präzisen Mosaikübersichtsaufnahme mikroskopisch digitalisiert.

2.2.12.5.3 Mosaikanfertigung der apikalen Probenschicht

Für die Anfertigung der Mosaikübersichtsaufnahmen der apikalen Probenschicht war die korrekte Fokussierung des Objektivs innerhalb der einzelnen Gitterpunkte von besonderer Bedeutung, da durch die Probentiefe von bis zu 1 mm deutlich stärkere Abweichungen der Fokussierungsebene zwischen den einzelnen Gitterpunkten auftraten.

Die Probenkrümmung löste sich bereits bei der ausdünnenden Präparation, weshalb keine weiteren Hilfsmittel zur geraden und ebenen Fixierung der Proben auf dem Objektträger notwendig waren.

Abbildung 18 zeigt eine solche Apikalaufnahme.

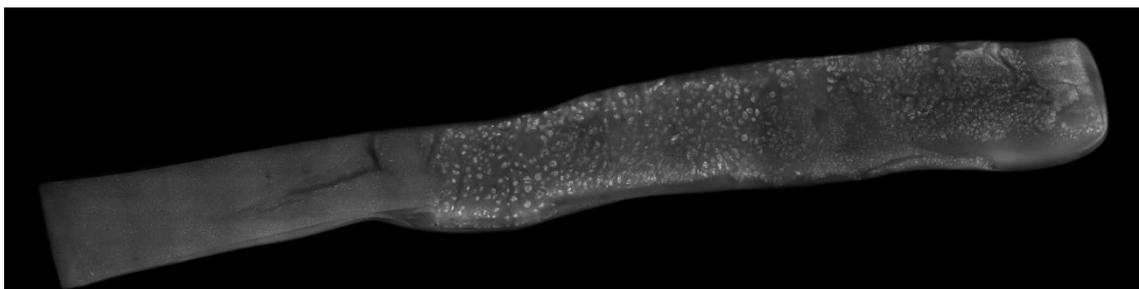


Abbildung 18: Fluoreszierende Apikalaufnahme (DAPI, Nuclei = weiß) einer Probe^[63]. Zu erkennen sind deutlich die in der Probenmitte lokalisierten Clusterformationen als Korrelat der tiefreichenden Knorpelläsion.

2.2.12.6 Aufbereitung der Aufnahmen

Die weitere Analyse und Bearbeitung der mikroskopischen Aufnahmen erfolgte software-gestützt. Zu vergleichenden qualitativen sowie zur quantitativen, statistischen zweidimensionalen Analyse war der Erhalt der Größenreferenzierung

obligat, weshalb diese direkt in AxioVision durchgeführt wurden. Die weiterführende Bearbeitung zur Segmentation der Knorpelzonen und einzelner SCSO sowie zur Aufbereitung der Aufnahmen erfolgten mithilfe der Software Illustrator und Photoshop.

2.2.12.6.1 Konvertierung der Aufnahmen

Die großen Rohdateien im AxioVision-spezifischen Dateiformat „Zeiss Vision Image“ (ZVI) mussten beim Export in ein nicht-softwarespezifisches Bildbearbeitungsformat konvertiert werden. Hierfür wurde das Dateiformat „TIF“ verwendet, welches eine verlustarme Konvertierung komplexer Bildformate ermöglicht. Selbiges Format wurde auch zur Generierung der Einzelschnittbilder während der Rekonstruktion der 3D-Datensätze am DESY verwendet.

Eine unbearbeitete Seitansicht-Aufnahme im „TIF“-Dateiformat umfasste mit den verwendeten Parametern und höchster Auflösung nach Export aus AxioVision eine digitale Speichergröße von ungefähr 0,30 bis 0,40 GB, eine Top-Down-Ansicht-Aufnahme etwa 0,10 GB.

Die nach Segmentation und Aufbereitung modifizierten Aufnahmen wurden anschließend durch verlustfreie Kompression hochauflösend in das Dateiformat „JPEG“ (nach dem Gremium „Joint Photographic Experts Group“) exportiert und konnten somit nachfolgend zu Veröffentlichungszwecken in Office Word 2016 und Acrobat DC importiert werden.

2.2.12.7 Zweidimensionale qualitative Analyse

2.2.12.7.1 Vergleich Reserve- und neuer Dünnschnitte

Nach Vorlage der hochauflösenden Mosaikaufnahmen der Dünnschnitte vor und nach Dehydratisierung konnten diese in AxioVision visuell miteinander verglichen und somit Aussagen über den Zustand des Gewebes vor und nach De- und Rehydratisierung getroffen werden.

2.2.12.7.2 Vergleich neuer Dünnschnitte mit aktueller Studienlage

Mit dem Ziel, einerseits die vorbeschriebenen Musterareale in den eigenen 2D-Aufnahmen reidentifizieren sowie andererseits diese in einer zweiten Ebene

bestätigen zu können, erfolgte die Evaluation der hochauflösenden Mosaikaufnahmen sowohl der Top-Down- als auch der Seitansicht.

Der visuelle Vergleich in Top-Down-Ansicht erfolgte direkt in AxioVision. Für die Bestätigung der SCSO in einer zweiten Ebene erfolgte nach visueller Reidentifizierung eine Segmentation der Seitansicht-Aufnahmen zur grafischen Hervorhebung der entsprechenden Areale. Hierzu wurden die „TIF“-Dateien in Illustrator importiert, die entsprechenden Zonen manuell mithilfe der „Pfad“-Funktion voneinander abgegrenzt und nachfolgend eingefärbt. Die farbliche Codierung entsprach hierbei derjenigen der später folgenden 3D-Segmentationen gemäß Tabelle 9. Einzelne Zellformationen konnten über das „Zoom“-Funktion vergrößert dargestellt werden.

Tabelle 9: Farbcodierung einzelner SCSO-Zonen

	RGB	HSV
Superficialzone (blau)	000 255 255	180 255 255
Single-Strings-Zone („SS“, grün)	000 255 127	149 255 255
Double-Strings-Zone („DS“, gelb)	255 255 127	060 128 255
Small-Clusters-Zone („SC“, orange)	255 170 000	040 255 255
Large-Clusters-Zone („LC“, rot)	255 000 000	000 255 255
Diffuse-Distribution-Zone („DD“, violett)	170 085 255	270 170 255

Eine nachfolgende Aufbereitung der Aufnahmen zu Veröffentlichungszwecken wurde in Photoshop durchgeführt. Hierbei wurde neben Artefaktreduktion zur Erstellung übersichtlicher Abbildungen die Begradigung der bereits beschriebenen Probenkrümmung in den Seitansicht-Aufnahmen vorgenommen. Dies konnte durch semitotales Teilen und Rotieren einzelner Bildabschnitte unter Erhalt der apikalen Probenkontinuität erreicht werden.

2.2.12.8 Zweidimensionale quantitative Analyse

Um die vorangegangenen, rein visuell detektierten und manuell segmentierten SCSO in deren Degenerationszonen statistisch zu untermauern, war eine

ergänzende quantitative Analyse notwendig. Zu Bestimmung der Zelldichte pro SCSO wurden in AxioVision für jedes SCSO je drei größenreferenzierte Rechtecke pro Areal mit entsprechend vorherrschendem SCSO auf die mikroskopischen Seitansicht-Aufnahmen projiziert und anschließend ausgezählt (Abbildung 22). Die Angabe der Arealgröße erfolgte in μm^2 mit einer Genauigkeit von zwei Nachkommastellen. Speicherung der Daten und Berechnung der Zelldichten erfolgte mittels Office Excel 2016.

Untersuchung auf Normalverteilung der Zelldichten erfolgte über Histogramme. Vergleichende Berechnungen der Zelldichten erfolgten über den Kruskal-Wallis-Test. Die post-hoc-Analyse erfolgte mittels Mann-Whitney U-Test. Alle verzeichneten p-Werte waren zweiseitig. Das Signifikanzlevel von $\alpha = 0.05$ wurde zur Vermeidung der alpha-Fehler-Kumulierung entsprechend der Falscherkennungsrate („False Discovery Rate“, FDR) durch Verwendung der Benjamini-Hochberg-Prozedur angepasst. Die grafische Darstellung erfolgte über Boxplots. Die vollständige statistische Analyse erfolgte mittels SPSS Statistics 23.^[1]

2.2.13 Dreidimensionale qualitative Analyse

2.2.13.1 Segmentation der Datensätze

Die Segmentationen der μCT -Datensätze erfolgte erneut in Amira im „Segmentation-Editor“, in welchem bereits die Entfernung des Trinkhalmes erfolgte. Zur Wahrung größtmöglicher Objektivität erfolgten diese überwiegend automatisiert. Zur Segmentation eines Objekts erfolgte in einem ersten Schritt dessen Identifizierung. Hierzu wurde die Vier-Perspektiven-Ansicht im Segmentationseditor genutzt. Nach Identifikation eines geeigneten Musters oder Musterareals erfolgte der Wechsel auf die Ein-Fenster-Ansicht in x/y-Ebene. Mithilfe der „Zoom“-Funktion konnten kleine Objekte besser dargestellt werden. Mittels Durchscrollen der Einzelbilder konnte das gesamte dreidimensionale Ausmaß festgestellt und durch Notieren der Schnittbildnummern festgehalten werden. Anschließend erfolgte das Festlegen einer „area of interest“, ergo wurde innerhalb der das Objekt begrenzenden Schnittbilder mittels der „Pinsel“-Funktion in rechteckiger Druckform ausreichender Größe ein Segmentationsbereich begrenzt. Diese zwei

selektierten Grenzquadrate wurden über die integrierte Funktion zur Interpolation zu einem quaderförmigen Block vereint und in ein temporäres Label gespeichert. Dank der Möglichkeit, die Segmentationsfunktionen auf ausgewählte Labels zu begrenzen, konnte somit die nachfolgende Segmentation auf einen deutlich kleineren Raum beschränkt und eine deutliche Performancesteigerung der Software erreicht werden. Wenn der segmentierte Block zusätzliche oder angeschnittene Objekte beinhaltete, die bei der nachfolgenden Segmentation nicht eingerechnet werden sollten, konnte anstatt der rechteckigen auch eine freihändige, individuelle Einzeichnung der Blockgrenzen mit anschließender Interpolation erfolgen. In beiden Fällen war es wichtig, den selektierten Block vor Labelexport erneut zu durchscrollen und sicherzustellen, dass das Zielobjekt vollständig inkludiert war. Nachfolgend wurden die Zellen und die sie unmittelbar lakunenförmig umgebende EZM innerhalb des Objekts segmentiert. Zur automatisierten Segmentation wurde die Selektion über Schwellenwerte mithilfe der „Threshold“-Funktion realisiert. Der reduzierte Datensatz wurde aus 8bit-Tiff-Einzelbildern rekonstruiert, was einem Graustufenbereich von 256 Werten (Range: 0–255, 0 = schwarz, 255 = weiß) entspricht. In den Datensätzen konnte eine klare Linksverschiebung der vorhandenen Graustufen in Richtung schwarz festgestellt werden. Da sich die Zellen bzw. deren Nuclei in der μ CT hell, jedoch nicht rein weiß darstellen, musste das Intervall für den Schwellenwert relativ groß gewählt werden, um nach subjektiv-visueller Einschätzung die Mehrheit der Zellen und möglichst wenig Material der PZM und EZM zu selektieren. Als hierfür geeigneten Grenzwert wurde #39 gewählt, ergo waren alle Graustufen von 39 bis 255 selektiert und in separate Zell-Labels gespeichert worden. Die Graustufen 0–38 wurden in Matrix-Labels gespeichert. Das Problem, das sich hierbei ergab war der störende Einfluss der Regionen, die sich innerhalb der primär festgelegten „area of interest“ aber außerhalb des Zielobjekts befanden. In der μ CT präsentierten sich diese EZM-Regionen dichteintensiver als der peri- und extrazelluläre, lakunenartige Raum innerhalb der SCSO, weshalb es zur ungewollten Selektion bei Segmentation der Zellen kam. Eine Methode, die hierfür entwickelt wurde bestand darin, zuerst die dunklen Lakunen innerhalb der SCSO zu selektieren. Bevor nun der Export in die entsprechenden Matrix-Labels erfolgte, wurden die kleinen Aussparungen

innerhalb der Selektion, welche die Zellen darstellten, über eine softwareintegrierte Funktion „fill holes“ in die Selektion inkludiert und in ein neues Label exportiert. Konnten größere Löcher nicht als solche erkannt und gefüllt werden, so konnte über die integrierte „Grow“-Funktionen die selektierte Matrix entweder zweidimensional oder als Volumen aufgebläht werden, wodurch sich die Löcher verkleinerten. Zu beachten galt es hier, dass die Selektion anschließend über die „Shrink“-Funktion zur größtmöglichen Wahrung der Objektivität sowie der Größenrelationen wieder verkleinert werden musste. Über die Fokussierung der Segmentation auf das erstellte Label konnte anschließend die eigentliche Isolation der Zellen und deren Export in ein separates Label erfolgen.

Zur Differenzierung der Labels innerhalb einer Probe bei lediglich binärer Datenstruktur war eine farbliche Markierung notwendig. Hierzu wurden Matrixlakunen und Zellen einheitlich gemäß nachfolgender Codetabelle gefärbt (Tabelle 10):

Tabelle 10: Farbcodierung einzelner Labels

	RGB	HSV
Matrixlakunen/Zellhöfe (cyan)	102 255 255	180 153 255
Nuclei (violett)	176 000 191	295 255 191

Die en bloc Segmentationen erfolgten analog der automatisierten Mustersegmentation. Hierdurch konnte größtmögliche Objektivität beim Nachweis der räumlichen Zusammengehörigkeit einzelner SCSO erreicht werden. Für die en bloc Segmentation der einzelnen Musterareale wurde ebenfalls analog der Mustersegmentation im Vorfeld jeweils eine „area of interest“ definiert. Da diese jedoch räumlich deutlich komplexer durch den Datensatz verliefen, war es für die Interpolation notwendig, Zwischenpunkte zu setzen. Um möglichst fließende und realitätsgetreue Zonen zu isolieren war die Freihand-Markierung notwendig. Da es nicht auszuschließen war, dass durch die Interpolation Überschneidungen mit bereits segmentierten Zonen auftreten, mussten die bereits erstellten Labels als schreibgeschützt definiert werden. Dies konnte über die „Lock“-Funktion erreicht werden.

Die erstellten Labels konnten mithilfe der „Arithmetic“-Funktion im Hauptfenster der Software aus dem Datensatz exportiert werden. Um die segmentierten Daten als separate Dateien exportieren und abspeichern zu können war es notwendig, diese jeweils vom Hauptdatensatz zu trennen. Hierfür wurde der „Crop-Editor“ verwendet, wofür eine temporäre Visualisierung der Labels notwendig war. Dies konnte durch Generierung einer Oberfläche mittels der „Generate Surface“-Funktion sowie Visualisierung dieser mittels der „Surface View“-Funktion auf den Datensatz erzielt werden. Die farbliche Markierung der Labels innerhalb des Segmentation-Editors konnte beim Export nicht übernommen werden, sodass sich die Labels gemäß derer binären Datenstruktur schwarz-weiß präsentierten. Zur Aufbereitung der Muster zu Präsentationszwecken konnten die Labels über eine „Smooth“-Funktion geglättet werden. Bei der Einstellung der Effektivität und der Anzahl an Wiederholungen des Glätte-Algorithmus galt es zu beachten, dass gerade die kleinen Teilobjekte eines Zell-Labels möglicherweise signifikant durch diese Datenmanipulation verändert würden. Über hochauflösende Screenshots konnten somit die ersten endgültigen 2D-Aufnahmen der Muster erstellt und exportiert werden. Hierfür war die temporäre farbliche Codierung der exportierten Labels notwendig, welche über die „Surface View“-Funktion eingestellt werden konnte. Die Erstellung der endgültigen Abbildungen erfolgte mittels der Software Illustrator.

2.2.13.2 Konvertierung und Export der Datensätze

Zur dreidimensionalen Darstellung der Labels war eine Konvertierung in Dateien vom Typ „3D Object Format“ (OBJ) erforderlich. Somit konnten die Daten in einem weiteren Bearbeitungsschritt mit der Software „MeVisLab“ für die digitale Veröffentlichung vorbereitet werden.

2.2.13.3 Erstellung digitaler Veröffentlichungen

Der Import der 3D-Muster in Adobe's „Portable Document Format“ (PDF) erfolgte mithilfe des MeVisLab-Plugins „Scientific3DFigurePDFApp“^[64], wodurch die Erstellung von Dateien des hierfür benötigten Typs „Universal 3D Format“ (U3D) ermöglicht wurde. Bei der Generierung dieser U3D-Modelle konnten die

korrespondierenden Matrix- und Zell-Labels zu einem jeweiligen SCSO, beispielsweise pLC zusammengeführt und entsprechend der Farbcodes in Tabelle 10 definitiv eingefärbt werden, sodass in einem interaktiven 3D-Rendering-Fenster im Adobe-Viewer das vollständige Muster farblich dargestellt und durchlaufen werden konnte. Die entsprechenden Labels konnten separiert oder zusammengefügt betrachtet werden konnten. Die Generierung dieser U3D-Modelle und deren Einbettung in eine präsentationsfähige PDF-Datei konnte simultan mithilfe dieses Plugins erfolgen.^[1]

2.2.14 Dreidimensionale quantitative Analyse

Ein Versuch der quantitativen Analyse eines pLC erfolgte anhand eines segmentierten Labels. Mittels des Plugins „3D Objects Counter“^[65] konnte die Zellzählung in Fiji durchgeführt werden. Hierbei wurde ein Watershed-Algorithmus auf die entsprechenden Daten, sprich ein segmentiertes Zell-Label, angewandt, welcher durch Berechnung der euklidischen Distanz zweier Objekte diese als eigenständig deklarierte und eine Trennlinie dazwischen zog. Die Summe dieser Objekte konnte hieraufhin ausgegeben werden.

Aufgrund der nach Abgleich mit der histologischen Zellzählung nicht konklusiven Resultate erfolgte keine Zählung der verbleibenden SCSO.

2.2.15 Verfassen der Dissertationsschrift

Die Ausarbeitung der Dissertationsschrift erfolgte mittels Office Word 2016 und Office Excel 2016. Schematische Darstellungen und Bildfolgen wurden mithilfe der Software Inkscape entwickelt. Fotografien, die nicht über Screenshots oder Bildexport innerhalb der entsprechenden Software generiert wurden, wurden mit einer 8 Megapixel Sony CMOS-Sensor 1/3.2" IMX175 Rear-Kamera eines Smartphones vom Typ Galaxy S3 der Firma Samsung aufgenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Studienpopulation

Die absolute Fallzahl beträgt 24. Das Alter der Studienteilnehmer zum Zeitpunkt der Teilnahme lag zwischen 43 und 85 Jahren (Mittelwert 65,42 Jahre). Von den insgesamt 24 Patienten, deren Femurkondylenresektate in dieser Studie verwendet wurden, wurden nach mikro- und makroskopischer Evaluation drei Proben für die zwei- und dreidimensionale Analyse selektiert. Die drei korrespondierenden Studienteilnehmer waren zum Zeitpunkt der Teilnahme 62, 67 und 62 Jahre alt. Diese drei Proben unterliefen ausnahmslos den im Methodenteil beschriebenen Bearbeitungsschritten inklusive Kontrastmittelfärbung mittels Propidiumiodid und Alkoholdehydratation.

3.2 Zweidimensionale qualitative Analyse

Bei diesen drei Proben konnte bereits bei der vorläufigen histologisch-qualitativen Beurteilung das zumindest partielle Vorhandensein aller Knorpelzonen, sprich der Superficialzone, der Übergangszone sowie der tiefen Radiärzone und der Tidemark mit dem darunterliegenden subchondralen Knochen aus der Seitansicht festgestellt werden. Nach erfolgter DAPI-Färbung der rehydratisierten Dünnschnitte mit anschließender Anfertigung von hochauflösenden Mosaikaufnahmen konnten die Zellen vom umgebenden Gewebe gut differenziert werden.

3.2.1 Vergleich der Dünnschnitte vor und nach De-/Rehydratisierung

Beim visuellen mikro- und makroskopischen Vergleich der neuen Dünnschnitte mit denjenigen, die vor der Dehydratisierung angefertigt wurden, konnten neben geringen morphologischen Unterschieden keine histologischen Differenzen festgestellt werden.

3.2.2 Auswertung in Top-Down- und Seitansicht

Die Identifizierung und Segmentierung der SCSO gemäß Tabelle 9 ist in den nachfolgenden Abbildungen veranschaulicht.

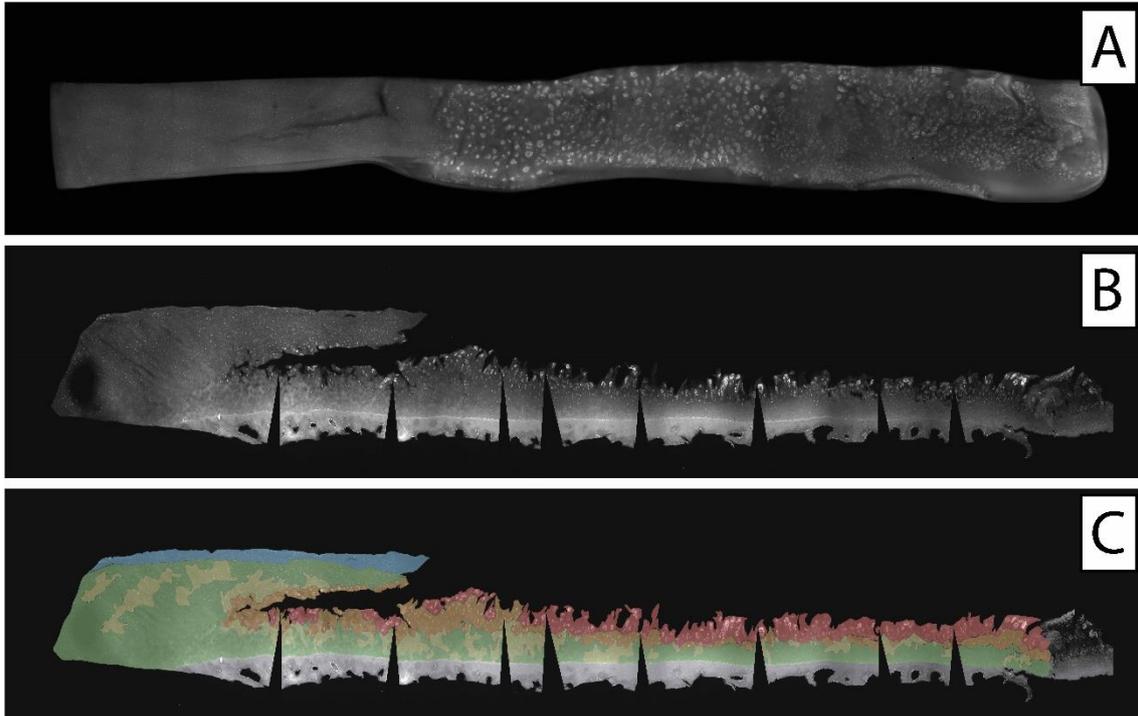


Abbildung 19: Fluoreszierende zweidimensionale Mehrperspektiven-Aufnahme (DAPI, Nuclei = weiß) der Probe #1 aus der Top-Down-Ansicht (A) sowie der Seitansicht (B+C)^[63]. In der zweiten Seitansicht (C) wurden die Zonen mit dem jeweils prädominanten SCSO segmentiert und farblich codiert hervorgehoben. Zur besseren Veranschaulichung wurden die Probenkrümmungen durch vertikale Gewebeeinschnitte begradigt (schwarze Dreiecke in B+C, nach apikal spitz zulaufend). In der Top-Down-Ansicht (A) scharfer Übergang einer homogenen Zellverteilung, häufig in Einzelstringformation und ohne fokale Konzentrationen von Fluoreszenzsignalen im linken Probendrittel zu einer Ansammlung rundlicher Zellgruppierungen mit verstärkter Fluoreszenz. Auffallend groß und hell leuchtend erscheinen die Gruppierungen im mittleren Probendrittel. In der Seitansicht (B) scharfer Übergang der Morphologie von reichlicher Probensubstanz mit homogenem apikalen Relief im linken Probendrittel zu einem ausgeprägten Substanzverlust mit deutlich aufgerautem apikalen Relief mit tiefgreifenden Fissuren. In der zweiten Seitansicht (C) scharfer Übergang der räumlichen Zellorientierung und -konzentration. Im linken Drittel bildet die oberste Schicht ein Areal mit tangential zur Knorpeloberfläche verlaufenden, überwiegend zu Einzelstrings formierten Zellen in hoher Konzentration (blau). Basal davon sind die Zellen überwiegend als arkadenförmige Einzelstrings (grün) und teilweise Doppelstrings (gelb) formiert. In den rechten beiden Dritteln fehlen die Zellen im Bereich des Substanzdefekts vollständig. Zwischen den tiefen, zellfreien Fissuren sind räumliche, große Zellgruppierungen mit hoher Fluoreszenzsignalkonzentration zu erkennen (rot), unmittelbar basal davon präsentieren sich Regionen kleinerer Zellgruppierungen (orange). In der basalen Knorpelzone vor dem subchondralen Knochen sind Einzel- und Doppelstrings zu finden.

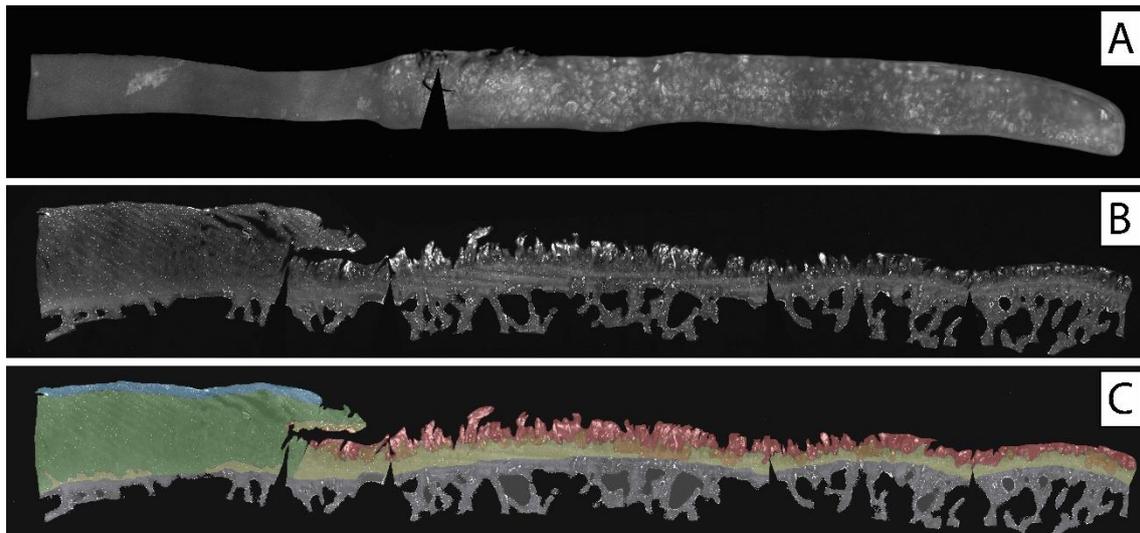


Abbildung 20: Fluoreszierende zweidimensionale Mehrperspektiven-Aufnahme (DAPI, Nuclei = weiß) der Probe #2 aus der Top-Down-Ansicht (A) sowie der Seitansicht (B+C)^[66]. In der zweiten Seitansicht (C) wurden die Zonen mit dem jeweils prädominanten SCSO segmentiert und farblich codiert hervorgehoben. Zur besseren Veranschaulichung wurden die Probenkrümmungen durch vertikale Gewebeeinschnitte begradigt (schwarze Dreiecke in A+B+C, nach apikal spitz zulaufend). In der Top-Down-Ansicht (A) scharfer Übergang einer homogenen Zellverteilung, häufig in Einzelstringformation und ohne fokale Konzentrationen von Fluoreszenzsignalen im linken Probendrittel zu einer Ansammlung rundlicher Zellgruppierungen mit verstärkter Fluoreszenz. Auffällig ist eine fleckige Aufhellung singulär und fokal im linken Drittel der Probe. In der Seitansicht (B) scharfer Übergang der Morphologie von reichlicher Probensubstanz mit homogenem apikalen Relief im linken Probendrittel zu einem ausgeprägten Substanzverlust mit deutlich aufgerautem apikalen Relief mit tiefgreifenden Fissuren. In der zweiten Seitansicht (C) scharfer Übergang der räumlichen Zellorientierung und -konzentration. Im linken Drittel bildet die oberste Schicht ein Areal mit tangential zur Knorpeloberfläche verlaufenden, überwiegend zu Einzelstrings formierten Zellen in hoher Konzentration (blau). Basal davon sind die Zellen überwiegend als arkadenförmige Einzelstrings (grün) und teilweise Doppelstrings (gelb) formiert. In den rechten beiden Dritteln fehlen die Zellen im Bereich des Substanzdefekts vollständig. Zwischen den tiefen, zellfreien Fissuren sind große räumliche Zellgruppierungen mit hoher Fluoreszenzsignalkonzentration zu erkennen (rot), unmittelbar basal davon präsentieren sich Regionen kleinerer Zellgruppierungen (orange). In der basalen Knorpelzone vor dem subchondralen Knochen sind Einzel- und vor allem Doppelstrings zu finden.

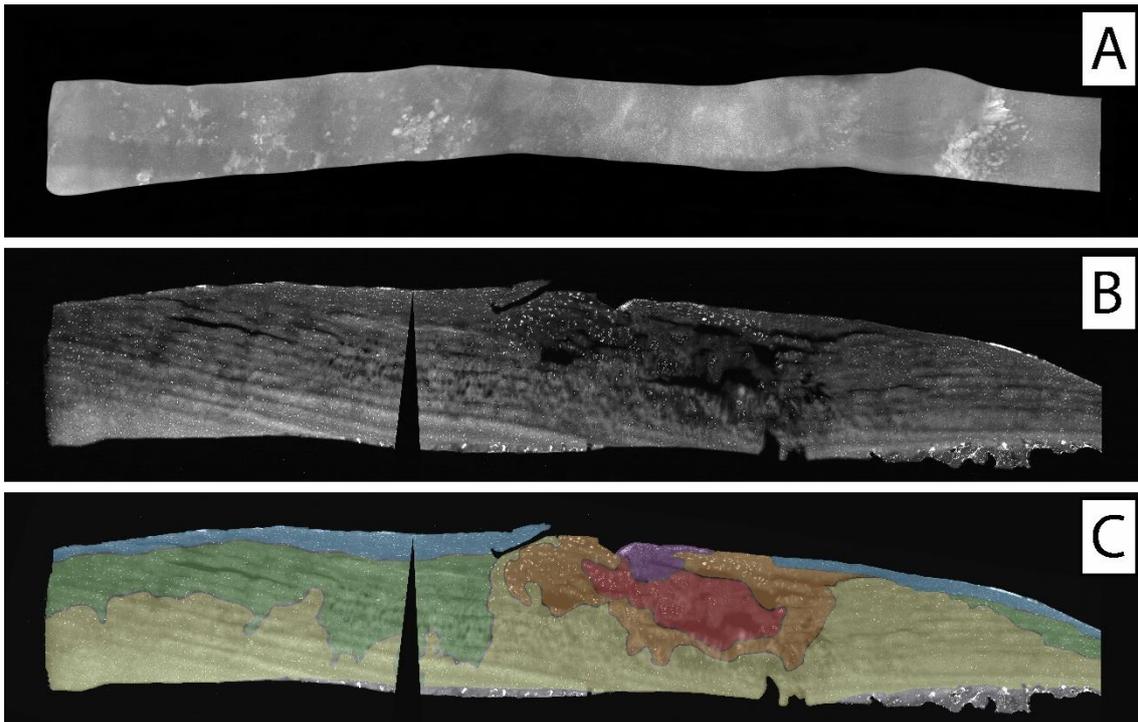


Abbildung 21: Fluoreszierende zweidimensionale Mehrperspektiven-Aufnahme (DAPI, Nuclei = weiß) der Probe #3 aus der Top-Down-Ansicht (A) sowie der Seitansicht (B+C)^[67]. In der zweiten Seitansicht (C) wurden die Zonen mit dem jeweils prädominanten SCSO segmentiert und farblich codiert hervorgehoben. Zur besseren Veranschaulichung wurden die Probenkrümmungen durch vertikale Gewebeeinschnitte begradigt (schwarze Dreiecke in B+C, nach apikal spitz zulaufend). In der Top-Down-Ansicht (A) beinahe flächendeckende homogene Zellverteilung, häufig in Einzelstringformation und ohne fokale Konzentrationen von Fluoreszenzsignalen. In einem kleinen Areal im von links gesehen dritten Viertel der Probe lassen sich diffuse, aber lokal konzentrierte Fluoreszenzsignale feststellen. Auffällig sind fleckige Aufhellungen multifokal im linken Drittel sowie als breiter Streifen im rechten Drittel der Probe. In der Seitansicht (B) beinahe flächendeckend einheitliche Morphologie mit reichlicher Probensubstanz und homogenem Relief. Fokal im von links gesehen dritten Viertel der Probe ist ein kleiner Substanzdefekt mit einer Reliefunregelmäßigkeit zu erkennen. In der zweiten Seitansicht (C) weitgehend einheitliche Zellorientierung und -konzentration, die oberste Schicht bildet ein Areal mit tangential zur Knorpeloberfläche verlaufenden, überwiegend zu Einzelstrings formierten Zellen in hoher Konzentration (blau). Basal davon sind die Zellen als arkadenförmige Einzelstrings (grün) Doppelstrings (gelb) formiert. Im von links gesehen dritten Viertel der Probe fehlt die blaue Zone ohne nennenswerten Substanzdefekt. Stattdessen sind große räumliche Zellgruppierungen mit hoher Fluoreszenzsignalkonzentration weit apikal lokalisiert zu erkennen (rot). Konzentrisch darum orientiert und U-förmig links und rechts davon an die apikale Probenoberfläche reichend sind räumliche Zellgruppierungen von geringerer Größe zu erkennen (orange). Dazwischenliegend und der roten Zone quasi plombenförmig apikal aufliegend ist eine Zone hoher Zellkonzentration ohne erkennbare strukturelle Formation zu erkennen (violett). Die basale Zone innerhalb dieses Probenviertels bilden vorwiegend Doppelstrings (gelb).

3.2.2.1 Deskriptive Analyse

Bei Betrachtung der histologischen Aufnahmen sowohl aus der Top-Down-, als auch aus der Seitansicht fallen deutliche Probenunterschiede mit scharfen Grenzen auf, die die jeweiligen Proben entsprechend der jeweiligen Morphologie und der zellulären Orientierung sowie der Zelldichte in zwei Gewebetypen einteilen lassen.

Gewebetyp 1 stellt jene dicken Probenabschnitte dar, in denen reichlich Gewebe mit homogenem apikalem Relief vorhanden ist. Auf zellulärer Ebene lassen sich von apikal nach basal Schichten unterschiedlicher Dicke anhand der jeweils vorherrschenden Zelldichte- und Verteilung voneinander abgrenzen. Sehr eindrücklich lässt sich das am Beispiel der Abbildung 21B innerhalb der linken Hälfte der Probe nachvollziehen. Die apikalste Schicht dieses Typs bildet jeweils eine Zone tangential verlaufender, dichter Einzelstrings. Die basal davon gelegenen Schichten stellen jene Knorpelbereiche dar, in denen beinahe ausnahmslos Zellen in Einzel- und teilweise Doppelstring-Formation vorliegen. Verglichen mit der blauen Schicht weisen die Zellen in dieser Schicht augenscheinlich eine geringere Dichte auf und die Strings sind apikal überwiegend willkürlich, in der Tiefe aber eher palisadenartig vertikal ausgerichtet. Insgesamt ist diese Schicht deutlich tiefreichender und grenzt teilweise unmittelbar an die Zone vor dem subchondralen Knochen. In Abbildung 19C, Abbildung 20C und Abbildung 21C entsprechen diese Areale überwiegend der grünen (Einzelstrings, diffus und teilweise radiär bzw. vertikal ausgerichtet) sowie der gelben Segmentation (Doppelstrings, meist radiär bzw. vertikal ausgerichtet).

Gewebetyp 2 stellt jene dünnen Probenabschnitte dar, in denen zumeist ein ausgeprägter apikaler Substanzdefekt vorhanden ist. Das apikale Relief ist regelhaft inhomogen und weist zumeist tiefreichende Fissuren auf. Auf zellulärer Ebene ist von apikal nach basal kein geordnetes Schichtmodell festzustellen. Verglichen mit Gewebetyp 1 fehlt die apikale Schicht mit den dicht gepackten, tangential verlaufenden Einzelstrings regelhaft vollständig. Somit bildet zumeist eine deutlich tiefer in der Probe lokalisierte Gewebeschicht die apikalste Schicht dieses Typs. In den Proben #1 und #2 stellt sich diese Schicht als flächendeckend

ausgefrante Zone mit tiefen Fissuren dar. Zwischen den Fissuren lassen sich ballonartige Ansammlungen von Zellen in sehr hoher Konzentration erkennen. Dazwischen in den Krypten ist vereinzelt Knorpelmatrix ohne Fluoreszenzsignale sowie größtenteils vollständige Abwesenheit von Gewebe zu erkennen. Unmittelbar basal dieser Knorpelzonen sind in allen drei Proben regelhaft Areale zu erkennen, in denen ähnliche Zellkonfigurationen vorherrschen, die Ballons aber insgesamt kleiner und mit augenscheinlich geringerer Zellzahl vorhanden sind. Eine Ausnahme ist in Probe #3 zu erkennen: Morphologisch ist kein wesentlicher Dickenunterschied zum Gewebetyp 1 zu erkennen, lediglich eine Unregelmäßigkeit des apikalen Probenreliefs mit einem kleinen, fokalen Substanzdefekt ist festzustellen. Die rote Zone mit den großen Ballons ist weiter apikal lokalisiert mit nicht streng basal davon lokalisierter, sondern diese Zone konzentrisch umgebender orangener Zone, welche ihrerseits links und rechts der roten Zone bis an die Probenoberfläche reicht. Dazwischenliegend an der Probenoberfläche präsentiert sich eine Zone, ähnlich einer Narbe mit diffuser Zellverteilung, in welcher verglichen mit den angrenzenden Zonen eine hohe Zelldichte vorzuliegen scheint. Die basale Schicht dieses Gewebetyps bildet in allen drei Proben eine Zone mit überwiegend Doppelstrings, während vor allem in Probe #1 gleichermaßen Einzelstrings festzustellen sind.

Bei Betrachtung der tiefen basalen Probenbereiche beider Gewebetypen lässt sich regelhaft eine Graustufendifferenz im Sinne einer extrazellulären Aufhellung erkennen. Die Zellen in dieser Schicht sind streng vertikal (radial) in String-Formation ausgerichtet. Im Gewebetyp 1 bildet diese Zone einen fließenden Übergang mit der darüberliegenden Zone, in welcher die basal gelegenen Zellen bereits eine radiale String-Formation aufweisen. Das Vorhandensein von Doppelstrings ist in Abbildung 20 und Abbildung 21 in dieser Zone vorwiegend. Ebenfalls im Gewebetyp 2 lässt sich flächendeckend eine solche extrazelluläre Aufhellung in der Probentiefe erkennen, jedoch erscheinen die darin vorkommenden Zellstrings weniger akkurat in Palisadenformation geordnet. Unmittelbar basal dieser hellen Knorpelschicht lässt sich regelhaft in allen Proben flächendeckend eine sehr dünne Schicht, ähnlich einer Linie, wellenförmig erkennen, die sehr hell bis fast weiß erscheint. Sie trennt das apikale Knorpelgewebe von einer basal

folgenden, sehr homogenen hellen und quasi zellfreien Zone, welcher als basalste Schicht der subchondrale Knochen folgt. Dieser präsentiert sich als unregelmäßige Struktur mit diffuser Zellverteilung.

3.2.2.2 Interpretation

Betrachtet man die Probenmorphologie sowie die Probenhistologie insbesondere aus der Seitansicht, so lässt sich unschwer erkennen, dass innerhalb der Proben Inhomogenitäten in Form von zusammenhängenden Arealen auftreten. Wie bereits beschrieben, lassen sich im Wesentlichen zwei Gewebetypen voneinander abgrenzen. Gewebetyp 1 weist eine hohe Knorpeldicke auf. Dies spricht für einen physiologischen oder nur moderat degenerativ veränderten Knorpel. Die Architektur mit den beschriebenen, sich in Zelldichte- und Ausrichtung voneinander unterscheidenden Gewebeschichten von apikal nach basal entspricht derjenigen des gesunden, hyalinen Gelenkknorpels. Die blaue Segmentation entspricht hierbei der zellreichen Superficial- bzw. Tangentialzone. Die darunter folgende, überwiegend grüne und teilweise gelbe Zone mit eher diffuser String-Anordnung (pSS, teilweise pDS) in augenscheinlich geringerer Zelldichte entspricht am ehesten der sogenannten Übergangs- oder Transitionszone. Die weiter basal folgende Zone mit aufgehellter EZM und vorwiegend vertikaler bzw. radialer String-Formation in augenscheinlich höherer Dichte entspricht der tiefen Radiärzone bzw. Tiefenzone des Knorpels. Die stark aufgehellte, horizontal verlaufende, sehr dünne Schicht entspricht der Tidemark des Gelenkknorpels. Darunterliegend zeigt sich die homogene, zellarme Gewebeschicht, die als Kalzifikations- oder Mineralisierungszone bezeichnet wird. Unmittelbar darunter stellt sich der subchondrale Knochen dar. Gewebetyp 2 weist in Abbildung 19 und Abbildung 20 eine deutlich geringere Tiefe auf, was bereits morphologisch für eine Degeneration mit Substanzdefekt spricht. Abbildung 21 stellt hierbei eine Ausnahme dar: Sowohl in horizontaler als auch in basaler Richtung ist die Ausbreitung dieses Gewebetyps deutlich geringer ausgeprägt. Auch histologisch lässt sich eine vollständige Umorganisation der Zellen dieses Gewebetyps erkennen. Die physiologische Knorpelschichtung ist nicht wiederzuerkennen. Die arkadenförmige Anordnung der Chondrozyten, wie man sie aus dem physiologischen Knorpel kennt

und auch in den gesunden Knorpelarealen deutlich zu reidentifizieren ist^[1], ist in den verbleibenden Schichten dieses Gewebetyps nicht wiederzuerkennen. Stattdessen finden sich in der Probentiefe, in der die tieferen Anteile der Transitionszone sowie die Radiärzone mit entsprechender arkadenförmiger Anordnung der Zellen analog derer des Gewebetyps 1 zu erwarten wären, ballonartige Zellcluster (pSC, pLC) unterschiedlicher Größe mit augenscheinlich sehr hoher Zelldichte und umgebend großflächigen Arealen mit sehr geringer Zelldichte bis hin zum vollständigen Substanzverlust. Erst in der Tiefe der basalen Bereiche der Radiärzone lässt sich eine Normalisierung der Knorpelarchitektur wiedererkennen, ein gehäuftes Auftreten von Doppelstrings (pDS) ist jedoch augenscheinlich zu erkennen. Diese Umorganisation der Zellen entspricht den degenerativen Veränderungsstadien, die bereits in den Vorstudien identifiziert wurden. Bereits dieser Blick aus der Seitansicht lässt schlussfolgern, dass das Auftreten dieser Zellcluster nicht auf eine Schicht und somit nicht auf eine rein horizontal ausgerichtete Ausbreitung beschränkt ist. Im Gegenteil sind diese SCSO wie beschrieben keiner Schicht des intakten Knorpels mehr zuzuordnen, sind hauptsächlich in den tiefen Regionen des Knorpels lokalisiert und können wie in Probe #3 zu sehen ist sogar bis an die Probenoberfläche reichen. Dies ist ein Erkenntnis des dreidimensionalen Ausmaßes der Knorpelschädigung, die man bei ausschließlicher Betrachtung aus der Top-Down-Ansicht nicht erlangen kann.

Bei Betrachtung der Proben aus der Top-Down-Ansicht lässt sich das Vorhandensein dieser zwei verschiedenen Gewebetypen aus einer in den Vorstudien^[5,43,44,47] bereits genutzten Perspektive bestätigen und somit die räumliche Ausdehnung der Knorpeldegeneration erahnen. Die Areale mit homogener Zellverteilung entsprechen exakt denjenigen Arealen der physiologischen Knorpelarchitektur mit an der Oberfläche tangential verlaufenden String-Formationen entsprechend des hier abflachenden Verlaufs der Arkaden. Bei der aus dieser Perspektive ermöglichten Betrachtung der Breitenausdehnung (z-Achse) lässt sich diese Knorpelschicht homogen weiterverfolgen. Das Vorhandensein der Zellcluster im korrespondierenden Areal der Knorpeldegeneration lässt sich ebenfalls in z-Richtung verfolgen, eine scharfe Abgrenzung zum gesunden Knorpel mit intakter SZ ist deutlich zu erkennen. Tangential verlaufende String-Formationen

fehlen erwartungsgemäß vollständig, da bereits bekannt ist, dass in diesen Arealen eine tieferliegende Knorpelschicht betrachtet wird. Im physiologischen Knorpel wären in dieser Tiefe lediglich einzelne Chondrozyten oder Zellpaare als Konsequenz der Betrachtung angeschnittener Arkadenstrings zu erwarten^[1]. Stattdessen lassen sich Neuansordnungen zu pathologischen SCSO wiedererkennen.

In der Probe #3 sind die Zellcluster erst bei näherer Betrachtung zu erahnen mit darüberliegender, deutlich dichteintensiverer diffuser Zellverteilung (pDD). Eine weitere Besonderheit in Probe #3 sowie singulär im linken Drittel der Probe #1 sind die fleckenförmigen Aufhellungen, die bei Betrachtung der Seitansicht keinem zellulären Korrelat zuzuordnen sind.

3.3 Zweidimensionale quantitative Analyse

Die zweidimensionale quantitative Analyse erfolgte anhand der in AxioVision definierten Auszählareale (Abbildung 22).

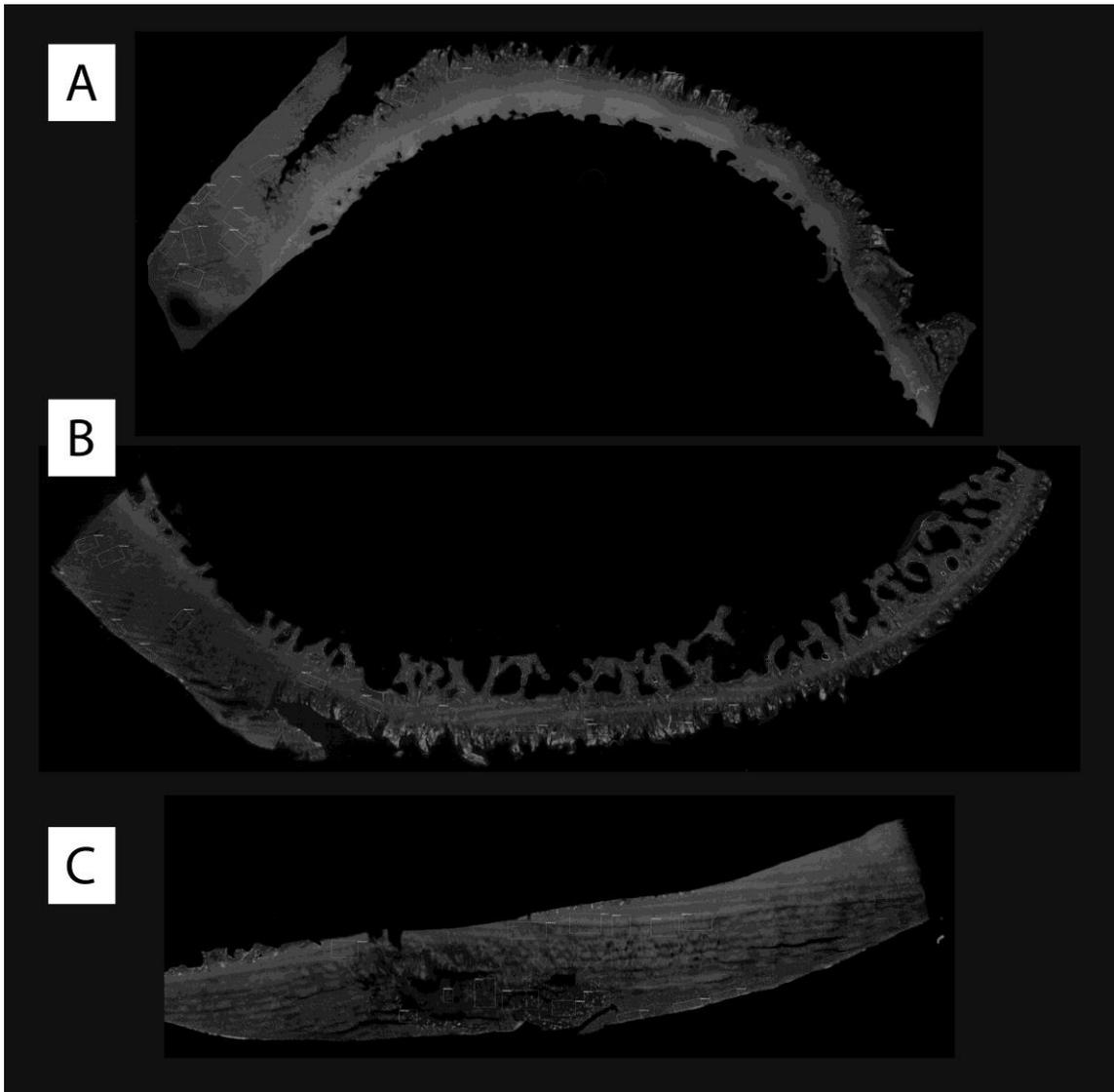


Abbildung 22: Fluoreszierende Seitensicht-Aufnahmen (DAPI, Nuclei = weiß) der Proben #1–3 (A–C)^[68]. Auf den Proben abgebildet sind jeweils 3 Auszählareale pro definierter SCSO-Zone zur quantitativen 2D-Auswertung. Die Proben weisen ihre natürliche Krümmung auf; In Probe #1 ist der Knorpel oben und der subchondrale Knochen unten lokalisiert (A), während in den Proben #2 und #3 der subchondrale Knochen oben und der Knorpel unten lokalisiert ist (B+C).

Nach statistischer Analyse der ausgezählten Zellareale konnten signifikante Unterschiede in den Zelldichten der jeweiligen Knorpelzonen (blau, grün, gelb, orange und rot) festgestellt werden (Abbildung 23). Da die Resultate nicht normalverteilt waren, wurden die Werte als Median dargestellt.^[1]

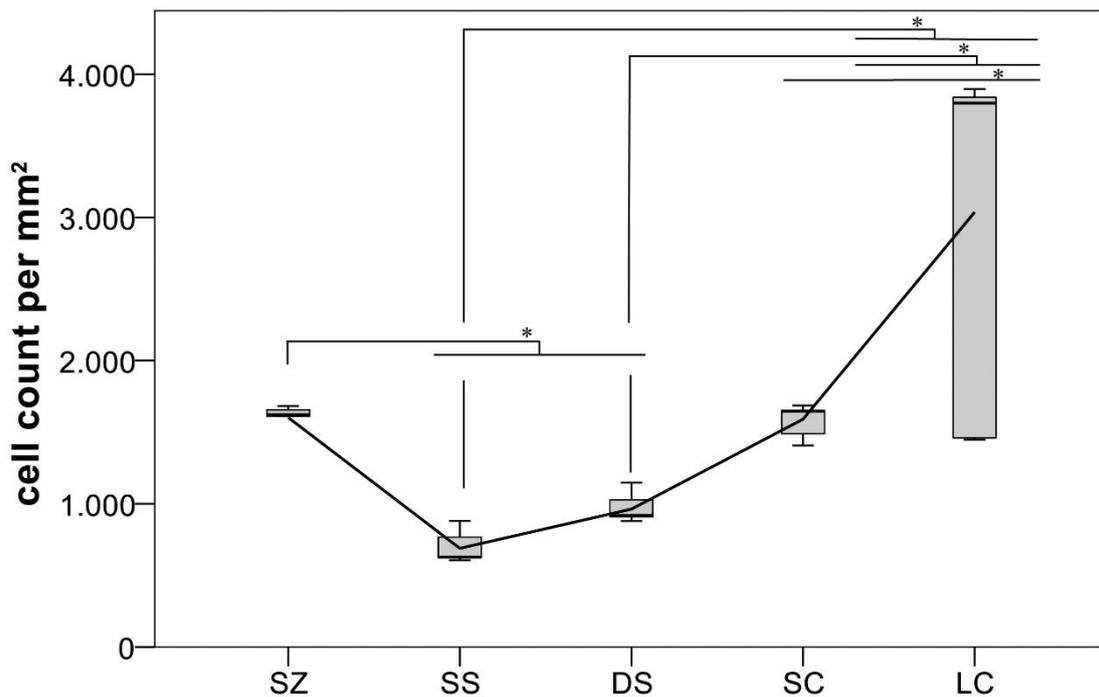


Abbildung 23: Zelldichten aufgeschlüsselt nach der zellulären Organisation: SZ = Superficialzone, SS = Single-Strings-Zone, DS = Double-Strings-Zone, SC = Small-Clusters-Zone, LC = Large-Clusters-Zone^[69]. Die zugrundeliegenden Daten sind den entsprechenden Tabellen zu entnehmen (Zelldichten: Tabelle 11; p-Werte: Tabelle 12). Die Lokalisation der entsprechenden SCSO-Zonen ist in Abbildung 19C, Abbildung 20C und Abbildung 21C visualisiert. Signifikante Unterschiede sind mit einem Sternchen (*) versehen.

Die höchsten physiologischen Werte wurden in der SZ gemessen, die niedrigsten Dichten wurden in Zonen außerhalb der SZ gemessen, in welchen vorwiegend pSS lokalisiert sind. Mit zunehmendem Degenerationsgrad und entsprechender zellulärer Umverteilung konnte auch ein Anstieg der Zelldichte festgestellt werden. So war ein Anstieg der Zelldichte von Zonen mit vorwiegend pSS auf Zonen mit vorwiegend pDS sowie von pDS auf pSC und weiterhin auf pLC festzustellen (Tabelle 11 und Tabelle 12).^[1]

Tabelle 11: Zelldichten der definierten SCSO-Zonen

Prädominierendes SCSO	Median (Interquartilenabstand) (Zellen pro mm ²)
SZ	1622 (126)
pSS	628 (157)
pDS	918 (124)

pSC	1646 (188)
pLC	3798 (2393)

Tabelle 12: Vergleich der Zelldichten und alpha-Fehler-Korrektur durch Verwendung der Falscherkennungsrate (FDR); Signifikante p-Werte sind fett gedruckt^[70].

Vergleich	p-Wert	FDR-adjustiertes alpha
Alle Mustergruppen	0,000001	0,000757
SS–SC	0,000041	0,001515
SS–SZ	0,000041	0,002272
SS–LC	0,000041	0,003030
DS–SC	0,000041	0,003787
DS–SZ	0,000041	0,004545
DS–LC	0,000041	0,005303
SC–LC	0,000165	0,006060
LC–SZ	0,024434	0,006818
SS–DS	0,062526	0,007575
SC–SZ	0,222419	0,008333

Betrachtet man die errechneten Werte auf Ordinalskalenniveau, so sind auf Basis eines FDR-adjustieren alpha alle Unterschiede mit Ausnahme des Vergleiches von SS mit DS und SC mit SZ signifikant.^[1]

3.4 Dreidimensionale qualitative Analyse

3.4.1 Auswertung vorläufiger Aufnahmen

In den vorläufigen μ CT-Messungen zur Verfahrensetablierung wurden folgende Methoden mittels Absorptionskontrast-Technologie gegeneinander getestet:

- Feuchte vs. dehydratisierte Proben
- Ethanoldehydratisierte vs. lyophilisierte Proben
- Native vs. Propidiumiodid-gefärbte Proben

Zweifelsfrei konnte bestätigt werden, dass zur Generierung der Aufnahmen unter Anwendung des Absorptionskontrastverfahrens eine Probendehydratation erfolgen muss. Die Resultate der hydratisierten Proben zeigten keinen ausreichenden Kontrast, um eine Aussage im Sinne der Fragestellung zuzulassen. Beim visuellen Vergleich ethanoldehydratisierter und lyophilisierter Proben konnten bei letzteren Proben deutlich erkennbare Artefakte durch dichteintensive Teilchen festgestellt werden, deren Präsenz auf eine Verunreinigung durch das beim Schleifvorgang verwendete Poliermaterial zurückgeführt wurde und eine suffiziente Auswertung unmöglich machte. Weiterhin sorgte das Abschleifen einzelner, fokal prominenter Strukturen für eine Verfälschung der Gewebeoberfläche, da sich durch die komplexe morphologische Verdrehung während des Lyophilisationsprozesses die Probenschichten neu ausrichteten. Beim visuellen Vergleich nativer und Propidiumiodid-gefärbter, jeweils dehydratisierter Proben konnten keine eindeutigen Unterschiede erkannt werden. In Zusammenschau durch mehrere Beurteiler wurde im Konsens entschieden, dass die Zellen in Propidiumiodid-gefärbten Proben möglicherweise eindeutiger zu differenzieren sind.

Für die definitive μ CT wurde daher die Verwendung Propidiumiodid-gefärbter, alkoholdehydratisierter Proben festgelegt.

3.4.2 Auswertung definitiver Aufnahmen

In den rekonstruierten Datensätzen der drei Proben konnten die beschriebenen Muster sowie die physiologischen Knorpelschichten und die Umorganisation im pathologisch-degenerativ veränderten Knorpel wiedererkannt werden (siehe Abbildung 24).

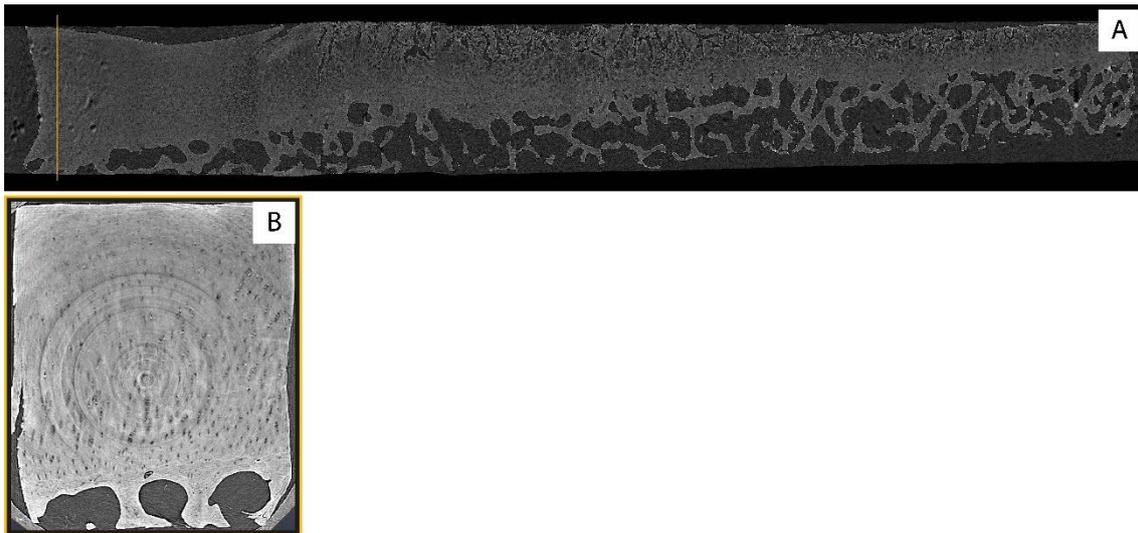


Abbildung 24: Seitansicht (A) sowie Querschnittsansicht (B) (y/z-Ebene) der dreidimensional rekonstruierten Aufnahme von Probe #2^[71]. Die orangene Linie in (A) markiert die Schnittebene. Die Seitansicht (A) demonstriert den zusammengesetzten, vollständigen Datensatz bestehend aus mehreren Tausend Einzelbildern. Ein beispielhaftes Einzelbild ist in der Querschnittsansicht (B) zu erkennen. In der Mitte dieser Querschnittsansicht ist das Drehzentrum der Probe in der μ CT zu erkennen, von welchem aus sich konzentrische Kreisartefakte über die gesamte Abbildung ausdehnen. Weiterhin sind basal links und rechts im Bild Anteile des Trinkhalms abgebildet, der als Einbettungsmedium diente und zur Schonung der Probe nicht vollständig extrahiert werden konnte.

Analog zur histologischen Analyse kann im linken Drittel der Seitansicht-Aufnahme der intakte Knorpel mit glatter, homogen erscheinender Superficialzone ohne Substanzdefekte festgestellt werden. Bei näherer Betrachtung fallen hell aufleuchtend und punktförmig die Zellen auf, deren Kerne sich durch die Kontrastmittelfärbung gut von der umgebenden, gräulichen EZM und hier insbesondere von jenen, sie unmittelbar umgebenden dichtearmen Höfen differenzieren lassen. Auch die degenerativ veränderten Probenabschnitte weiter rechts in Abbildung 24 weisen die vorbeschriebenen Merkmale auf: Die apikale Proben-schicht ist zerklüftet mit darin und darunter sichtbaren, dunklen Clusterlakunen, welche ihrerseits kleine helle Zellen enthalten. Noch deutlicher als in der Mikroskopie lassen sich die dichtearmen Matrixlakunen innerhalb der Cluster von der diese SCSSO umgebenden EZM abgrenzen. Die Schichtung im physiologischen Probenbereich lässt sich aus der Seitansicht-Aufnahme nicht einfach erkennen, wohl aber in der y/z-Ebene wiederfinden. Durch die Hervorhebung der unterschiedlichen Gewebeschichten lassen sich in unmittelbarer Zellperipherie Höfe als

dichteärmere, dunklere Region um einzelne oder kleinste Gruppen von Zellen abgrenzen. So lassen sich im unteren Bereich der Abbildung 24 die vertikal verlaufenden Strings klar von der umgebenden EZM abgrenzen. Nach apikal ist auch die arkadenförmige Abflachung der Strings wiederzuerkennen.

3.4.2.1 Segmentation der SCSO

Die histologisch in früheren Studien vorbeschriebenen und in dieser Studie zweidimensional wiedererkannten, mit unterschiedlichen Knorpeldegenerationsgraden assoziierten SCSO konnten in allen drei Proben bestätigt werden. Eine Ausnahme bildet das pDD, welches bereits histologisch lediglich in Probe #3 festgestellt werden konnte. Die nachfolgenden drei Abbildungen demonstrieren das Auftreten dieser Muster durch beispielhafte Segmentation jeweils eines Vertreters innerhalb der entsprechenden Knorpelzone mit dessen Prädominanz.

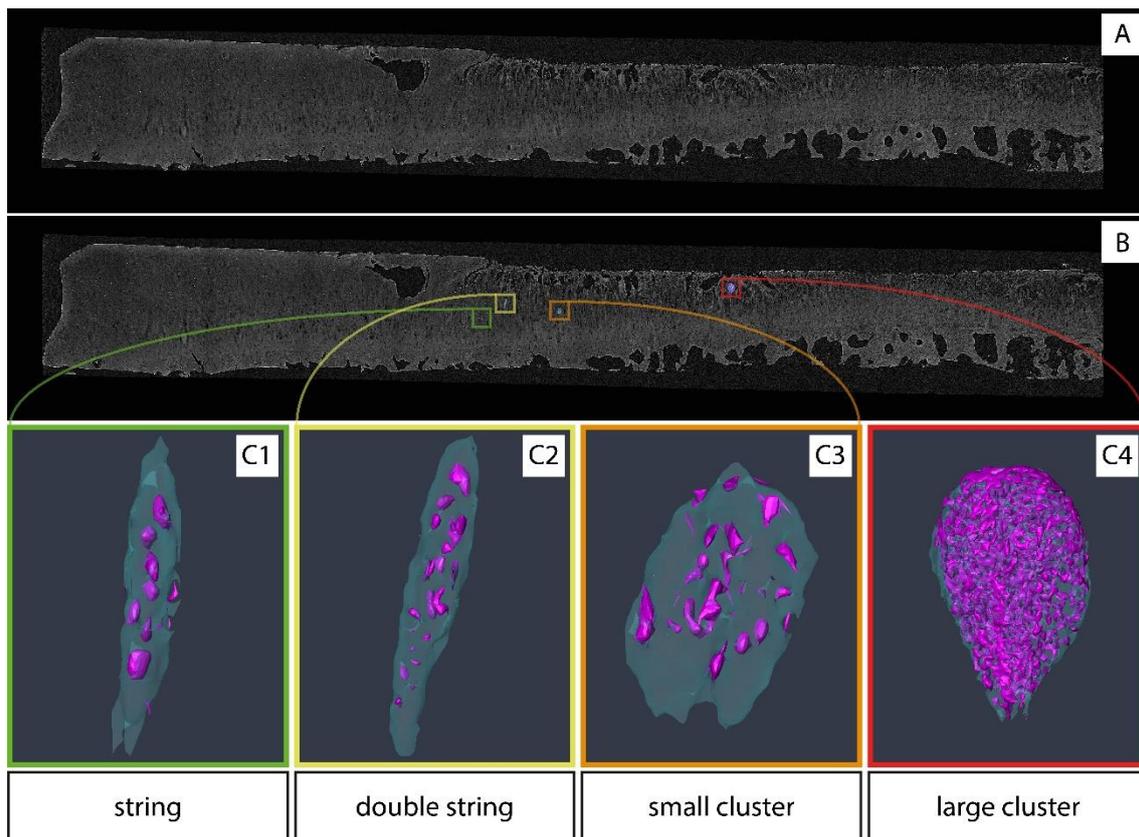


Abbildung 25: Identifikation individueller SCSO in Probe #1^[72]. Seitansicht nativ (A); Seitansicht mit Hervorhebung segmentierter Muster (B); Großansicht der segmentierten Muster mit farblicher Codierung (C1–4, keine einheitliche Skalierung): cyan-transparent: Matrixlakunen, violett: Nuclei.

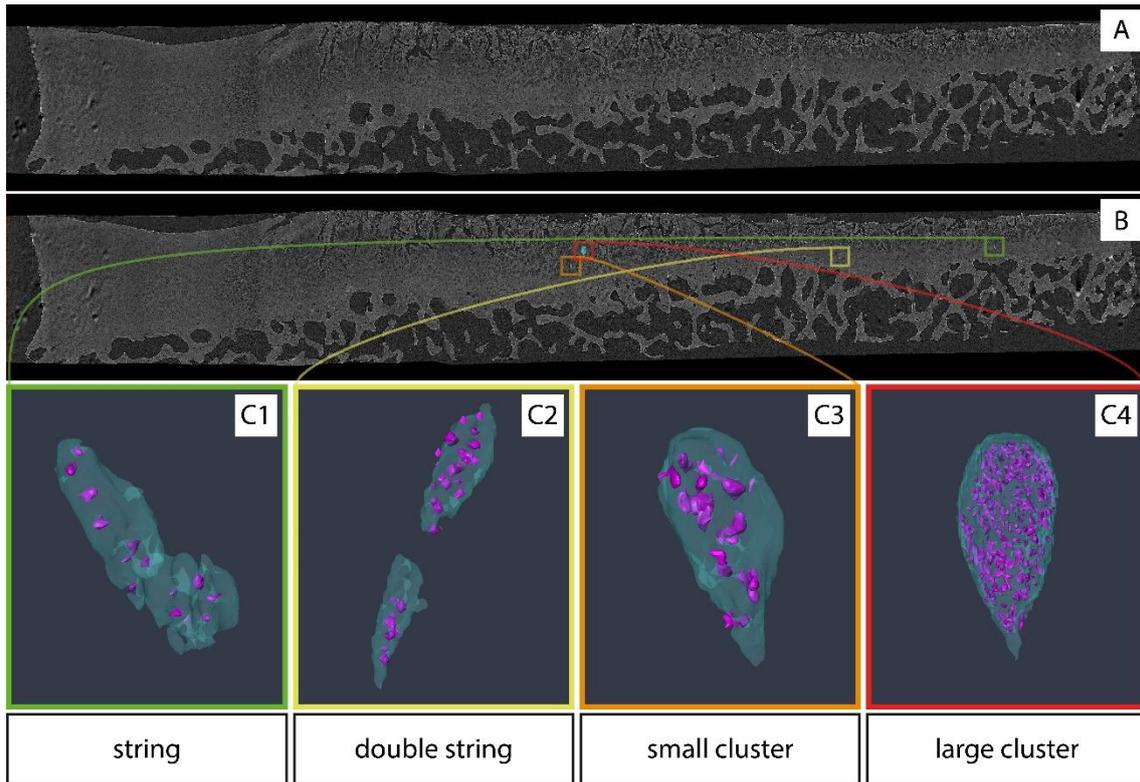


Abbildung 26: Identifikation individueller SCSO in Probe #2^[73]. Seitansicht nativ (A); Seitansicht mit Hervorhebung segmentierter Muster (B); Großansicht der segmentierten Muster mit farblicher Codierung (C1–4, keine einheitliche Skalierung): cyan-transparent: Matrixlakunen, violett: Nuclei.

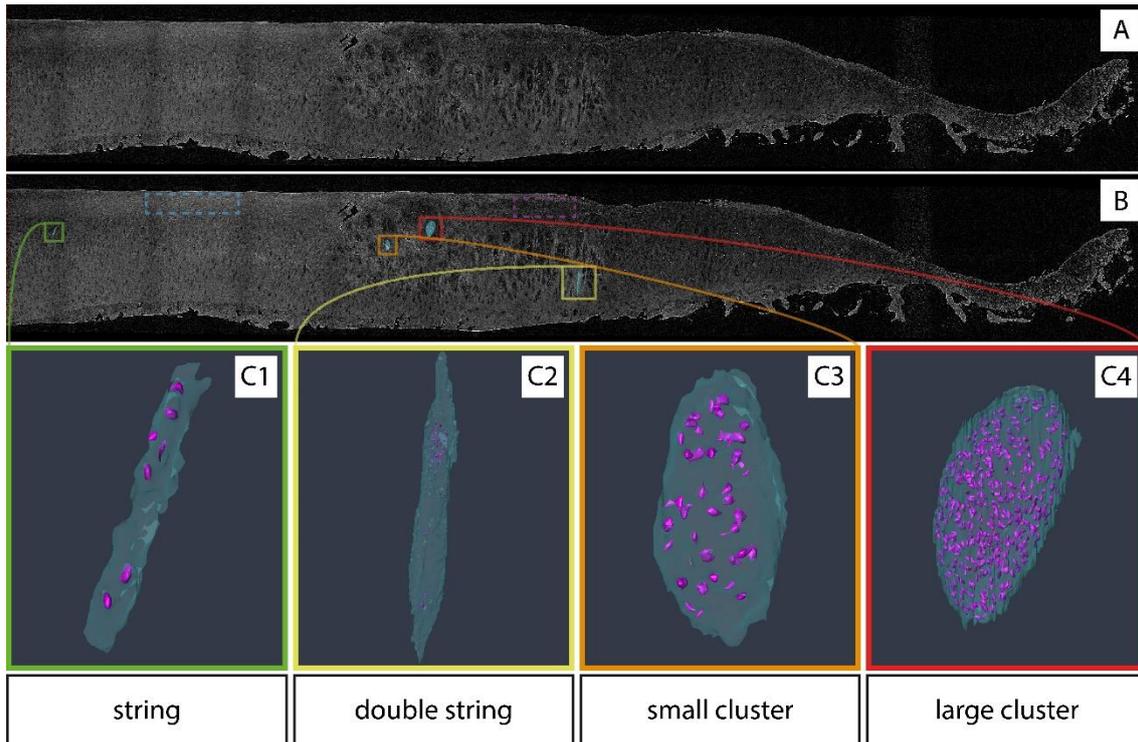


Abbildung 27: Identifikation individueller SCSO in Probe #3. Seitansicht nativ (A); Seitansicht mit Hervorhebung segmentierter Muster (B); Großansicht der segmentierten Muster mit farblicher Codierung (C1–4, keine einheitliche Skalierung): cyan-transparent: Matrixlakunen, violett: Nuclei.

Bei Betrachtung der segmentierten Muster fällt auf, dass die Größe der einzelnen Nuclei stark variiert. Weiterhin ist deutlich die Dichtezunahme mit der Größe der Cluster in allen Proben zu erkennen. Interessanterweise scheinen die Cluster zu einer nach basal spitz zulaufenden, dreidimensionalen Tropfenform zu tendieren, was nicht nur in den aufgeführten Abbildungen zu erkennen war. Nachfolgend in Abbildung 28 ist detailliert je SCSO ein dreidimensional segmentierter Vertreter in Form einer Übersichtstabelle veranschaulicht.

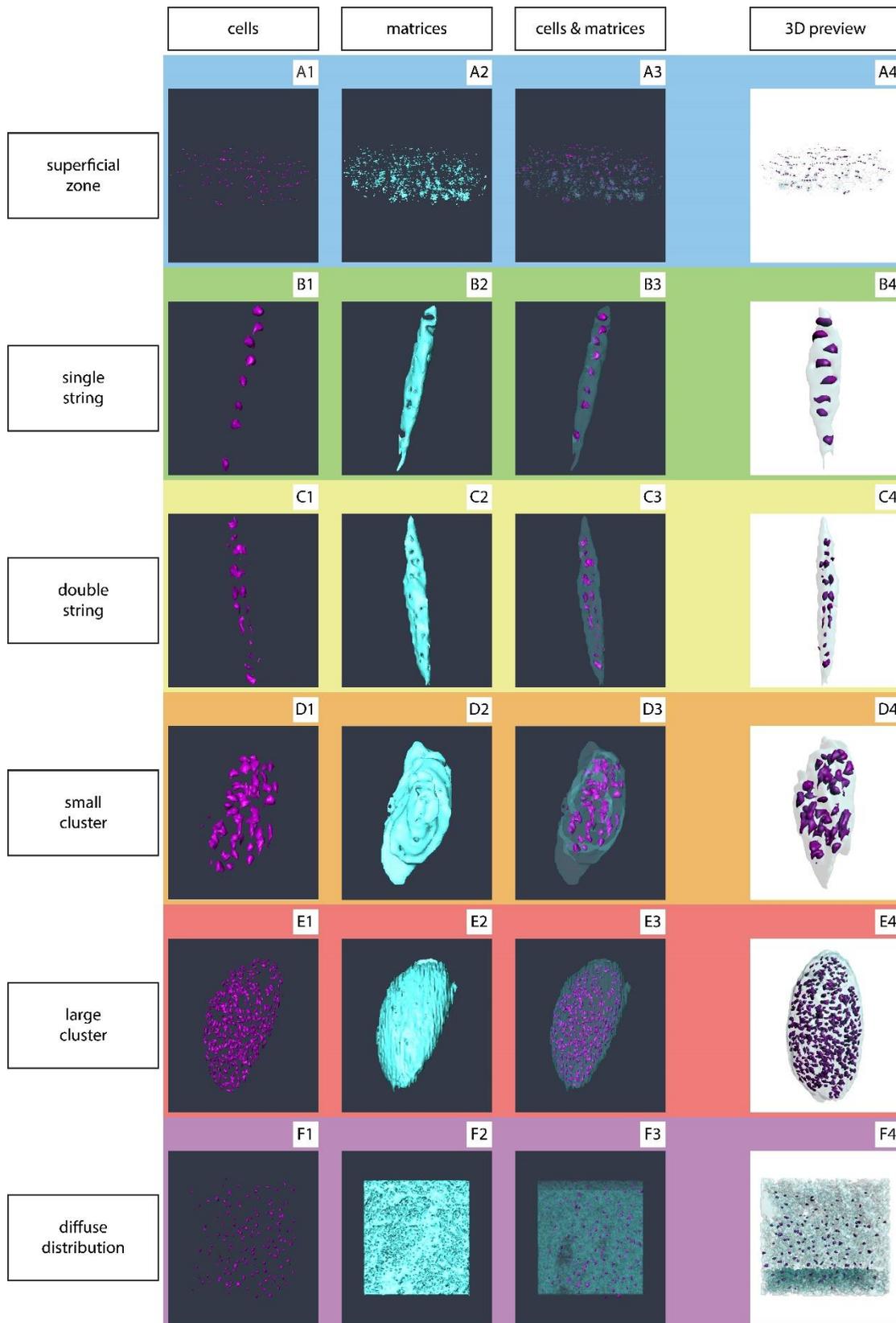


Abbildung 28: Übersicht eines segmentierten Vertreters je SCSO^[74]. Spalte 1 demonstriert die Nuclei (violett), Spalte 2 die Matrices (cyan) und Spalte 3 eine Kombination

aus Nuclei (violett) und Matrices (cyan-transparent). Spalte 4 zeigt Standaufnahmen eines interaktiven 3D-Modells, wie es in der digitalen Version als PDF-Datei vorhanden ist und interaktiv betrachtet werden kann. Wie zu erkennen ist, wurde zur Segmentierung der diffusen Zelldistribution eine kubische Form aus der Probe #3 in der entsprechenden Zone markiert und in toto in die entsprechenden Labels gespeichert (F1–4).

Zur besseren räumlichen Darstellung der Musterintegration in die Proben und Hervorhebung des räumlichen Zusammenhangs der beschriebenen Muster in den jeweiligen Musterzonen erfolgten Segmentierungen zusammenhängender Blöcke unter Verwendung eines gleichbleibenden Schwellenwertes zur Sicherung der Objektivierbarkeit (Abbildung 29 und Abbildung 30).

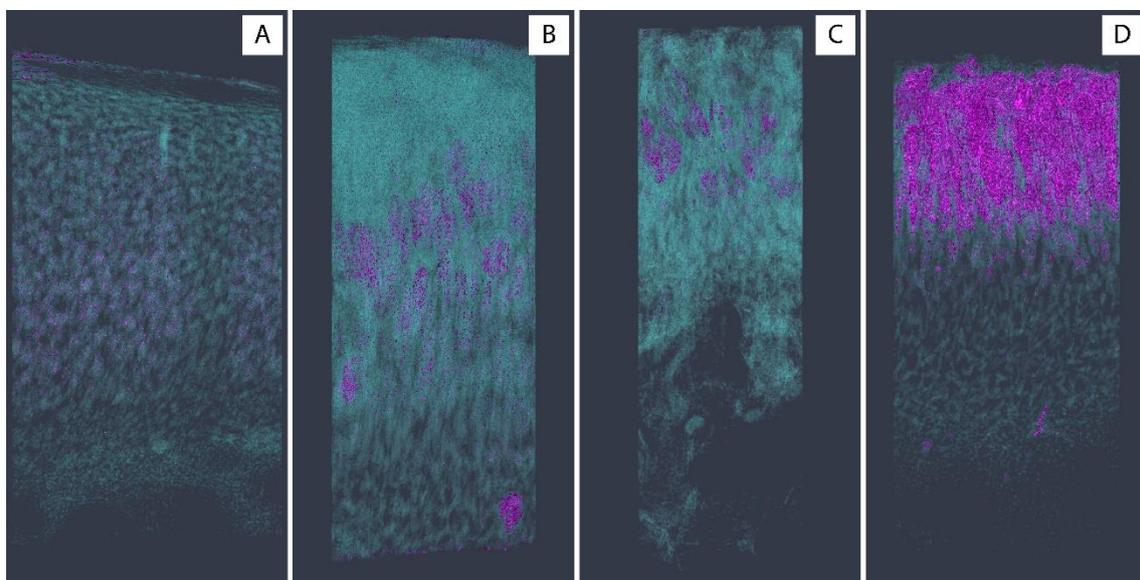


Abbildung 29: Segmentierung kompletter Musterzonen en bloc (Matrix = cyan-transparent, Nuclei = violett)^[75]. Physiologischer Knorpel (A), Double-Strings-Zone (B), Small-Clusters-Zone (C) und Large-Clusters-Zone (D).

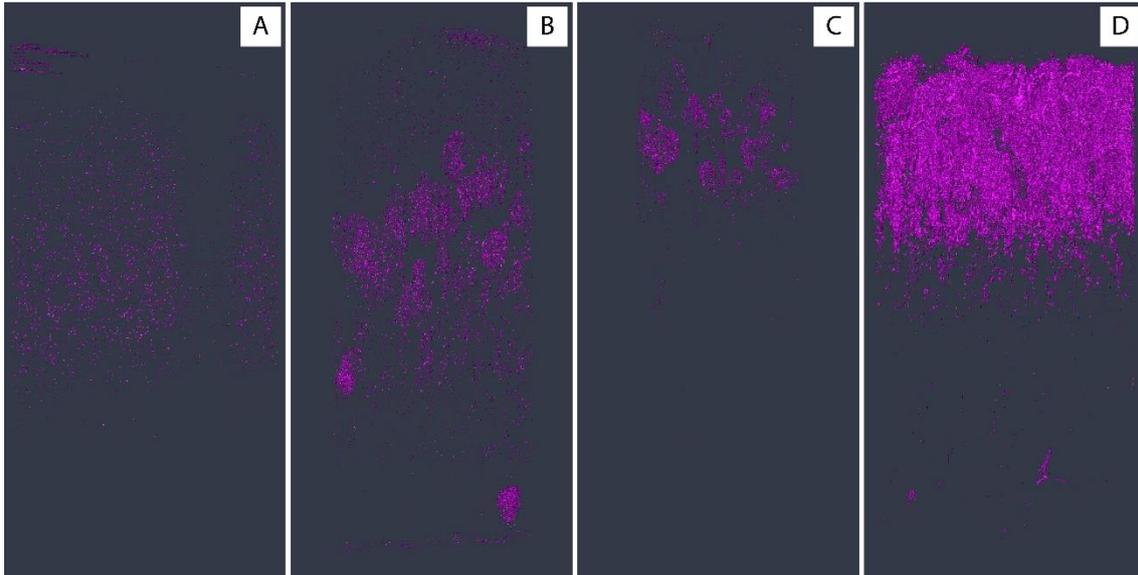


Abbildung 30: Segmentierung kompletter Musterzonen en bloc (Nuclei = violett)^[75]. Physiologischer Knorpel (A), Double-Strings-Zone (B), Small-Clusters-Zone (C) und Large-Clusters-Zone (D).

Die en-bloc-Segmentationen bestätigen nicht nur den räumlichen Zusammenhang der entsprechenden Mustertypen, sondern heben auch augenscheinlich die Dichtezunahme der Zellen mit steigendem Degenerationsgrad hervor (Abbildung 30).

Zur zweifelsfreien Demonstration des räumlichen Zusammenhangs der histologisch definierten SCSO in den entsprechenden Musterzonen erfolgte ebenfalls eine vollständige en-bloc-Segmentierung der gesamten Probenblöcke mit nachfolgender Rekonstruktion zu interaktiven 3D-Modellen, welche in entsprechende PDF-Dateien eingebettet wurden (Abbildung 31). Durch Anwendung derselben farblichen Codierung (Tabelle 9) konnte hierdurch sehr eindrücklich die räumliche Ausdehnung der beschriebenen Degenerationszonen sowie deren spezifische Lokalisation und räumlicher Zusammenhang mit der OA innerhalb der Probe illustriert werden.

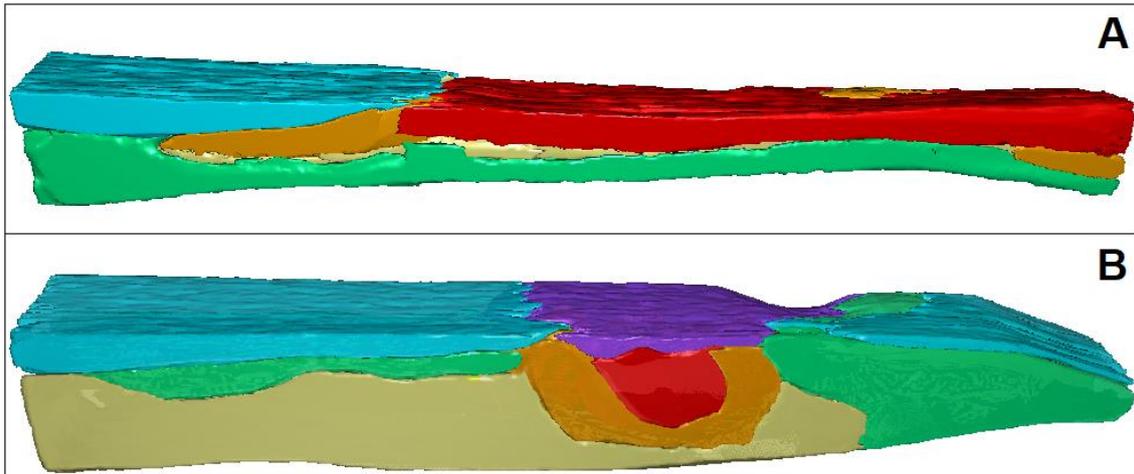


Abbildung 31: Standaufnahmen der vollständigen en-Bloc-Segmentation der Proben #1 (A) und #3 (B) zur Visualisierung des dreidimensionalen Zusammenhangs der SCSO-Zonen analog der zweidimensionalen SCSO-Zonen-Segmentation in Abbildung 19C und Abbildung 21C^[63,67]. Superfizialzone = blau, Single-Strings-Zone = grün, Double-Strings-Zone = gelb, Small-Clusters-Zone = orange, Large-Clusters-Zone = rot, Diffuse-Distribution-Zone = violett (B). Zur Hervorhebung der dreidimensionalen Ausdehnung der SCSO-Zonen wurden die Proben um die x-Achse in Richtung Betrachter gekippt.

3.5 Dreidimensionale quantitative Analyse

Bei der Zählung der einzelnen Strukturen innerhalb eines pLC konnte festgestellt werden, was bereits bei qualitativer Betrachtung der segmentierten Muster offensichtlich war: Die Zellzahl war nicht annähernd so hoch wie bei der histologischen Auszählung, weshalb auf weiterführende Analysen verzichtet wurde. Im Diskussionsteil wird noch einmal zu dieser Thematik Stellung genommen.

4 Diskussion

Osteoarthrose beschreibt ein irreversibles, degeneratives Erkrankungsbild der Gelenke, dessen Entstehung und Pathophysiologie bedingt ist durch ein komplexes Zusammenwirken multipler zellulärer und extrazellulärer Faktoren. Chondrozyten erfüllen eine Schlüsselfunktion in der Versorgung und Gewährleistung der Stabilität des Gelenkknorpels. Es liegt daher nahe, dass eine Minderung der Chondrozytenzahl sowie Veränderungen derer physiologischer Organisation, Verteilung und Funktion einen entscheidenden Einfluss auf die Degeneration des Gelenkknorpels hat.^[1]

In dieser Studie wurde die räumliche Organisation und Verteilung der Chondrozyten des Kniegelenk-Knorpels humaner Femurkondylen untersucht. Durch zwei- und dreidimensionales visuelles Hervorheben von Zonen unterschiedlicher Lokalisation innerhalb des Gelenkknorpels mit dem jeweils prädominanten SCSO im Sinne einer Kartografie konnte gezeigt werden, dass die räumliche Anordnung der Zellen vom Ausmaß der lokalen Gewebeschädigung abhängt.

4.1 Qualitative Erkenntnisse

Mittels Seitansicht-Aufnahmen von Dünnschnitten derselben Knorpelproben konnte das Vorhandensein von horizontalen Zellstrings in der intakten Superfizialzone bestätigt sowie das Auftreten vertikal verlaufender Zellstrings entlang der Kollagenarkaden in der tiefen Zone des mikroskopisch intakten Knorpels aufgezeigt werden.

In stark geschädigten Knorpelregionen mit tiefreichenden Fissuren konnten zentral der Läsion bzw. in unmittelbarer Nähe zum Substanzdefekt große Zellcluster (pLC) festgestellt werden, welche regelhaft von Arealen kleinerer Zellcluster (pSC) umgeben waren. Selbige Zellcluster konnten im Bereich einer fokalen Knorpelläsion über die gesamte Probentiefe bis auf das Niveau der daneben angrenzenden Superfizialzone des augenscheinlich intakten Knorpels reichend identifiziert werden. Im Übergangsbereich dieser Knorpelregionen hoher Schädigung zu den Knorpelbereichen ohne Substanzdefekt und erhaltener

Superficialzone waren die vorherrschenden SCSO pDS. Diese Doppelstrings konnten weiterhin häufig am Übergangsbereich von der Tidemark zur tiefen Zone sowohl in Bereichen des intakten Knorpels, als auch im deutlich substanzgeminderten Knorpel festgestellt werden. Diese Beobachtungen lassen die Hypothese aufkommen, dass es zwei Sorten von Doppelstrings gibt: Die eine Sorte ist diejenige, die im Zuge der zellulären Umstrukturierung anzutreffen ist, welche wie bereits vorbeschrieben in den an eine osteoarthrotische Läsion angrenzenden Knorpelzonen mit noch erhaltener Superficialzone stattfindet^[47]. Die andere Sorte scheint an der Knorpelbasis zu entstehen. Da diese tiefe Knorpelzone bereits in früheren Studien als ein mögliches Reservoir für chondrogene Progenitorzellen mit der Fähigkeit zur Proliferation und möglicherweise Knorpelregeneration beschrieben wurde^[76], könnten die Doppelstrings das Resultat einer proliferativen Aktivität des Gelenkknorpels darstellen.^[1]

In einer Probe (#3) konnte ein zusätzliches räumliches SCSO fokal konzentriert beschrieben werden, welches ähnlich eines Pfropfs oder einer Narbe der sich darunter befindenden, fokal konzentrierten Knorpelläsion apikal aufsaß. Innerhalb dieser Region wiesen die Zellen keine erkennbare höhere räumliche Struktur mehr auf, stattdessen präsentierte sich das Bild einer diffusen, unorganisierten Zellverteilung (pDD). Auch dieses SCSO ist in den Vorstudien bereits beschrieben und als letztes Stadium der vollständig ausgeprägten OA mit resultierendem, schrittweisen Zellverlust definiert worden^[44,47].^[1]

4.2 Zelluläres Remodelling

4.2.1 Bestätigung der SCSO

Rolauffs et al. konnten in mehreren Studien demonstrieren, dass superfizielle Chondrozyten im Rahmen eines „Remodellings“ bzw. einer räumlichen Umstrukturierung deren zelluläre Organisation beeinflussen können^[5,47]. Selbige Autoren deuteten zuletzt ein neues Modell der zellulären räumlichen Organisation im Zuge einer sich entwickelnden und fortschreitenden OA an^[44]: Bedingt durch Einflüsse einer beginnenden OA scheinen die Chondrozyten ein räumliches

Remodelling von Zellpaaren und Einzelstrings im gesunden Knorpel zu Doppelpaaren und Doppelstrings im beginnenden OA-Knorpel zu durchlaufen^[47]. Mit fortschreitender OA formieren sich die Zellen dann zu kleinen Clustern (pSC), welche schrittweise in der Größe wachsen, bis sie in höheren OA-Graden zu großen Clustern (pLC) herangereift sind. Als letzte Stufe in der endgradigen OA verlieren die Zellen vollständig ihre räumliche Anordnung ohne erkennbare, höhere Organisation. Die in dieser Studie erlangten Erkenntnisse konnten dieses Modell des räumlichen zellulären Remodellings in allen Knorpelschichten prinzipiell bestätigen, nicht nur in der Top-Down-, sondern auch in der Seitansicht, wodurch eine dreidimensionale Betrachtung der Knorpelläsionen ermöglicht werden konnte. Mit der Identifikation dieser SCSO in unterschiedlichen Knorpeltiefen konnte demonstriert werden, dass dieses zelluläre Remodelling keiner Bindung an spezifische Knorpelschichten unterliegt. Entsprechend hat eine Umbenennung dieser Zellmuster zu erfolgen um zu verdeutlichen, dass diese (S)CSO nicht auf die SZ beschränkt sind.

Die Anzahl an Zellen innerhalb eines solchen Clusters variierte von einem Dutzend bis hin zu mehreren Hunderten^[42,77]. Wie bereits erwähnt, waren die großen Cluster stets im Zentrum der Knorpeldegeneration mit dem höchsten Ausprägungsgrad der OA festzustellen, häufig lokalisiert zwischen tiefreichenden Fissuren der EZM^[77]. Interessanterweise waren die Cluster nie in der anatomischen Superficialzone zu finden. Dieser Fakt ist deshalb so interessant, da die Superficialzone anatomisch bedingt die direkte Kontaktfläche für mechanische Lasten ist. Eine Theorie hierfür ist, beruhend auf der durch die bisherigen Forschungsergebnisse gestützten Assoziation der Cluster mit fortgeschrittenen Stadien der OA, dass die Superficialzone noch vor Bildung jener Cluster bereits vollständig erodiert ist.^[1]

Die Abhängigkeit dieser lokal prädominierenden (S)CSO vom jeweiligen Grad der Knorpeldegeneration sowie die Abwesenheit der Cluster im mikroskopisch intakten Knorpel unterstützen Rolauffs Andeutung, dass reife Chondrozyten die Fähigkeit besäßen, sich selbst zu reorganisieren und somit von Einzelzellen und

Zellpaaren im intakten Knorpel zu Doppelstrings, kleinen und letztendlich großen Clustern umzuformieren^[5,47].^[1]

4.2.2 Ursachen der zellulären Umstrukturierung

Die zugrundeliegenden Ursachen sowie die detaillierten Mechanismen zur zellulären Umverteilung zu den entsprechenden (S)CSO sind bis dato weiterhin nicht ausreichend geklärt. Basierend auf der Beobachtung, dass die Formation großer Cluster (pLC) ein wesentliches Kennzeichen der fortgeschrittenen OA sind wurde proponiert, dass Apoptose, Zellteilung sowie direkte Zellmigration der Hauptantrieb dieser zellulären Reorganisation seien^[78-80].^[1]

Man ist schon längst von der Ansicht abgekommen, dass Chondrozyten singuläre, spärlich verteilte „Einzelgänger“ seien, die während der Knorpelentwicklung durch progrediente Ausdehnung der EZM ausschließlich als eigenständige Zellen agierten. Ursache für den Denkwandel war der Nachweis von weitläufigen, interzellulären Verknüpfungen über sogenannte „gap junctions“, wodurch sowohl eine Zell-zu-Zell-, als auch eine Zell- zu EZM-Kommunikation im Sinne einer „Zyтомatrix“ ermöglicht war^[81-84]. Beispielhaft konnten in einer Kleintierstudie bei der Untersuchung von Zellpaaren innerhalb der Superficialzone des Kniegelenk-Knorpels erwachsener Hasen gleich mehrere Belege hierfür aufgeführt werden: Die Chondrozytenpaare waren lediglich von einer sehr dünnen EZM-Platte voneinander separiert; die Zellorganellen der beiden Chondrozyten waren quasi spiegelbildlich entlang der EZM-Platte angeordnet; in diese EZM-Platte strahlten zytoplasmatische Ausläufer beider Zellen ein; der Nachweis von gap junctions konnte über den Nachweis von Connexin-43 erbracht werden; der schnelle interzelluläre Transfer konnte durch einen fluoreszierenden Farbstoff „Calcein-AM“ nachgewiesen werden, die Bestätigung dessen konnte durch die Transferinhibition durch Verwendung des gap-junction-Blockers „Octanol“ erbracht werden. Bereits diese Erkenntnis legt nahe, dass eine interzelluläre Kommunikation für die suffiziente Erfüllung der Aufgaben der Chondrozyten erforderlich ist.^[81] Einen Beleg für diese Theorie liefern Le Graverand et al., die sogleich ein Modell für die Entstehung der Cluster im osteoarthrotischen Gewebe anbringen. Am

Lebendtierversuch wurde Meniskusgewebe vor sowie einige Wochen nach chirurgischer Durchtrennung des vorderen Kreuzbandes auf zellulärer Ebene untersucht. Hierbei konnten die Autoren feststellen, dass im Zuge der unphysiologischen Last auf den Meniskus im Rahmen der Kreuzbanddurchtrennung zelluläre sowie interzelluläre Veränderungen auftreten. In Vorstudien konnten selbige Autoren bereits aufzeigen, dass die beschriebenen OA-spezifischen zellulären Prozesse auf jene im artikulären Knorpel übertragbar sind. Mittels Darstellung von Vimentin konnte nachgewiesen werden, dass sich die sternförmige Chondrozytenform innerhalb eines komplexen interzellulären Netzwerks sowie deren homogene Verteilung innerhalb dieses Netzwerks hin zu isolierten Zellinseln mit zunehmender morphologischer Abrundung verändert. Die intrazelluläre Vimentinpräsenz demonstrierte sich kompaktiert und es resultierte der Verlust des interzellulären Netzwerks. Als Ursachen für den Verlust dieses Netzwerks und somit Initiierung isolierter Zellinseln werden sowohl OA-bedingte Apoptose^[85-87], als auch eine nachgewiesene Zellproliferation mit morphologischer Abrundung verantwortlich gemacht^[85]. Ob diese morphologische Umwandlung der proliferierenden Zellen eine unmittelbare Folge der durch Apoptose bedingten Diskontinuität des interzellulären Netzwerkes ist, lassen die Autoren offen. Obwohl besagte Apoptose im OA-Gewebe allgemein anerkannt ist, ist es bis dato schwer abzuschätzen, inwiefern die chondrozytäre Apoptose zur Pathogenese der OA und zur Clusterbildung beiträgt^[88-91]. Die Zellproliferation selbst konnte durch Nachweis von Ki-67 sowie durch Hämatoxylin-Eosin-Färbung bewiesen werden und konnte nicht im physiologischen Knorpel der Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Durch diese morphologische Zellabrundung und resultierendem Verlust des interzellulären sowie des Zell-Matrix-Netzwerks würde die Isolation und somit Clusterbildung weiter gefördert. Mit zeitlicher Distanz zur Operation konnte eine Größenzunahme der Cluster festgestellt werden. Ausgereifte Cluster (pLC) bestanden aus runden, dicht gepackten Zellen mit umgebend großen, zellfreien Matrixregionen. Die dichte räumliche Anordnung der Zellen innerhalb der Cluster lässt die Annahme zu, dass zumindest zwischen den Zellen innerhalb jener Cluster noch eine interzelluläre Kommunikation besteht. Für die Größenzunahme der Cluster wird die nachgewiesene Zellproliferation verantwortlich gemacht.^[85]

Weitere Studien konnten, neben dem Nachweis von Ki-67 auch durch den Nachweis von beispielsweise „Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen“ (PCNA), die Zellproliferation innerhalb dieser Cluster bestätigen^[92]. Die exakte Ursache zur Anregung der Zellproliferation ist bis dato ungeklärt. Als Triggerfaktoren kommen zum Beispiel eine Variation an Wachstumsfaktoren in Betracht, die von OA-Chondrozyten exprimiert werden^[93-96].

Aufgrund der Ähnlichkeit der Anordnung dieser Zellen während des Clusterwachstums zu rechteckigen Stäben mit der Anordnung der hypertrophen Chondrozyten in der mineralisierten Knorpelzone während der enchondralen Ossifikation^[97,98] haben die Autoren erfolgreich versucht, das für jene hypertrophen Chondrozyten typische Kollagen Typ X sowie eine vermehrte Anreicherung von Kalzium in der Clusterperipherie im Sinne einer Mineralisierung jener Knorpelregion nachzuweisen. In den dreidimensionalen Aufnahmen dieser Studie konnte eine erhöhte Dichte in der unmittelbaren Clusterperipherie festgestellt werden, die an eine dicke Clusterhülle erinnert. Möglicherweise ist diese Dichtezunahme auf eine Mineralisierung der umliegenden EZM mit trotz erfolgter Dekalzifizierung verbleibender Kalziumanteile zurückzuführen. Zusammengefasst lassen diese Erkenntnisse die Autoren zusätzlich annehmen, dass die Bildung großer Cluster (pLC) im OA-Gewebe ein Versuch des Organismus sein könnte, das Gewebe ähnlich der primären Knorpelentstehung selbst zu regenerieren.^[85]

Eine weitere Theorie zur Clusterbildung ist jene der Zellmigration. Kouri et al. haben bereits 1996 proponiert, dass Chondrozyten, die innerhalb der EZM verteilt liegen, aufeinander zuwandern und Cluster bilden können^[99]. In diversen in-vitro-Studien konnte diese Fähigkeit der Chondrozyten zur Migration unter Stimulation durch diverse Chemotaxis-induzierende Substanzen belegt werden^[100-103]. Wie diese Zellwanderung in vivo im dreidimensionalen Gewebe wie dem Gelenkknorpel ablaufen soll, ist bis dato jedoch ungeklärt. Eine mögliche Erklärung ist jene, dass die Zellwanderung und Musterbildung durch die OA-assoziierte Auflockerung der EZM erleichtert wird, aber schlussendlich bleibt dieses Thema eine kontroverse Theorie.^[1]

4.2.3 Ursachen und Folgen der veränderten Zellkonzentration

Wie bereits angeführt, nimmt die Zelldichte im Verlauf der Gelenkknorpelentwicklung im Rahmen des Wachstums und der Ausdehnung der EZM deutlich ab und persistiert im adulten Knorpel weitestgehend^[104-107]. Innerhalb der Oberfläche des adulten Gelenkknorpels variiert die Zelldichte ebenfalls. Eine mögliche Erklärung hierfür sind die lokal unterschiedlich auf die Knorpeloberfläche einwirkenden mechanischen Lasten^[108,109]. Mittels der Untersuchung dieser Zelldichten war es in dieser Studie möglich die Aussage zu stützen, dass die räumliche zelluläre Organisation ein geeignetes bild-basiertes Verfahren zur Beurteilung der Knorpeldegeneration sein kann. Mit Ausnahme des Vergleichs von SS und DS konnte für jede der vorbeschriebenen räumlichen (S)CSO-Zonen eine eigene charakteristische Zelldichte festgestellt werden, die sich signifikant voneinander unterscheiden. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass trotz einer hohen gezählten Zelldichte in der Superficialzone die niedrigsten Zelldichten in den tieferen Knorpelzonen des intakten Gelenkknorpels mit ebenfalls überwiegendem Auftreten von pSS festzustellen waren. Diese Erkenntnis deckt sich mit der aktuellen Studienlage^[106,110,111]. Von hohem Stellenwert ist die Erkenntnis, dass die gezählten Zelldichten anstiegen, je pathologischer die jeweilige (S)CSO, ergo je fortgeschrittener der mit dem Muster assoziierte OA-Grad war. Diese Feststellung unterstreicht noch einmal die Theorie und die Rolle der Zellproliferation im Rahmen der (S)CSO-Pathogenese.^[1]

Die Auswirkungen dieser erhöhten Zelldichte auf die Physiologie und die Pathophysiologie des Gelenkknorpels ist bis dato nicht ausreichend geklärt. Wie bereits im Rahmen der Clusterentwicklung geschildert, scheint das zelluläre Remodelling selbst mit konsekutiver Isolation und Verlust der interzellulären Kommunikation einen negativen Einfluss auf die Knorpelmorphologie und -funktion zu haben, wodurch eine Progredienz der OA noch gefördert würde. Diese Meinung wird in weiteren Studien geteilt^[112-115]. Felka et al. konnten anhand eines Fall-Kontroll-Versuchs beobachten, dass gesteigerte Zellproliferation in Knorpelgewebe zu einem vorzeitigen Verlust der Zellorganisation mit gesteigerter Zelldichte führt, was eben jenem in selbiger Studie beschriebenen Endstadium der OA (pDD) entspricht. Hierzu wurde Knorpelgewebe früher OA-Stadien mit

überwiegender Präsenz von pSS und pDS vor und 28 Tage nach Induktion der Zellproliferation innerhalb der Fallgruppe mittels eines Fibroblasten-Wachstumsfaktors (basic fibroblast growth factor bFGF bzw. FGF-2) verglichen. Die Kontrollgruppe zeigte keine ersichtlichen Veränderungen der SCSO. In der Fallgruppe hingegen konnten keine pSS oder pDS mehr nachgewiesen werden, stattdessen zeigte sich der Verlust der SCSO mit deutlich gesteigerter Zelldichte. Durch diese Beobachtung konnte deren Hypothese einer durch Zellproliferation in frühen OA-Stadien getriggerten Progredienz der OA erhärtet werden.^[44] Boehme et al. untersuchten in einem Review die Zellproliferation zusammen mit den zwei weiteren Schlüsselmechanismen zur Entstehung und Progredienz der OA, den Abbau und den Zerfall der EZM sowie inflammatorische Prozesse auf molekularer Ebene. Deren Bestreben war es offenzulegen, ob Proliferationsfaktoren wie beispielsweise der FGF-2 oder der Transforming Growth Factor beta (TGF- β), pro-inflammatorische Cytokine wie das IL-1 β , das IL-6 oder der TNF- α sowie Regulation der micro-Ribonukleinsäure (miRNA) einen induzierenden Einfluss auf die jeweiligen drei Schlüsselmechanismen haben sowie in welchen Sequenzen der OA-Entstehung und -progredienz diese Mechanismen eine Rolle spielen. Ferner sollte herausgefunden werden, ob es möglicherweise einen spezifischen Faktor gibt, der alle drei Mechanismen induzieren kann. Die Autoren fassten zusammen, dass die Proliferation das Schlüsselement in der frühen Phase der OA-Entwicklung bei der Entwicklung von pSS zu pDS ist. Simultan erfolgt der Abbau und der Zerfall der PZM und somit der EZM durch diverse katabole Faktoren wie Matrix-Metalloproteinasen (MMP). Wesentliche Hauptfaktoren zur Induktion dieser Zellproliferation wie FGF-2 und TGF- β sowie pro-inflammatorische Zytokine wie IL-6 induzieren ferner auch die Genexpression kataboler Faktoren. Die Proliferation hingegen wird von pro-inflammatorischen Zytokinen nicht induziert, sondern im Gegenteil sogar durch diese gehemmt. Diese Erkenntnis lässt schlussfolgern, dass Inflammation nicht zur Entwicklung der frühen OA führt und somit die Proliferation vor der Inflammation einsetzt. Der Abbau der EZM beginnt simultan zur Zellproliferation und schreitet, begleitet von später einsetzender Inflammation, mit zunehmender OA fort. Ferner wird dargestellt, dass speziell der Wachstumsfaktor FGF-2 zusätzlich die messenger-RNA-Expression (mRNA) pro-

inflammatorischer Zytokine wie IL-1 β induziert und somit als einziger Faktor in der Lage ist, alle drei Schlüsselmechanismen zur OA-Entwicklung zu induzieren. Somit ist FGF-2 der einzige Faktor, der sowohl die proliferative Phase der frühen OA-Entwicklung als auch die spätere Abbau- und Inflammationsphase der fortschreitenden OA induziert. Da IL-1 β wiederum die Expression von FGF-2 induziert, ist FGF-2 in der Lage, einen selbst-aufrechterhaltenden und selbst-verstärkenden Kreislauf der Inflammation zu induzieren, was ein wichtiges Merkmal der späten OA darstellt.^[116]

Die Präsenz von Chondrozyten ist essentiell für die Homöostase und die Fähigkeit zur Reparatur des artikulären Knorpels. Demnach könnte die Erhöhung der Zelldichte selbst allerdings auch einen vorteilhaften Effekt für den Knorpel haben. Zumindest muss die Zellproliferation im OA-Knorpel als Reaktion und Versuch des Organismus betrachtet werden, das verbleibende Gewebe zu reparieren und aufrechtzuerhalten^[117]. Auf der anderen Seite können Chondrozyten auf direkten biomechanischen Stress sowie im Rahmen einer vorhandenen Entzündungsreaktion des Gewebes durch Hochregulation der synthetischen Aktivität sowie durch erhöhte Produktion von proinflammatorischen Zytokinen reagieren^[118]. Das Vorhandensein einer hohen Zelldichte kann somit zu ausgedehnten Konzentrationen der proinflammatorischen Zytokine sowie katabol wirkender Enzyme und somit zum Abbau und zur weiteren Zerrei β ung des Knorpelgewebes und möglicherweise zu einer sich selbst aufrechterhaltenden Entzündungsreaktion mit Potential zur Förderung der Zellproliferation führen^[1]. Dies würde die schnelle Entstehung von Riesencleistern mit mehreren hundert beinhaltenden Zellen erklären, welche vereinzelt im OA-Knorpel festgestellt werden können^[1]. Durch besagten Abbau und Einrisse im Knorpel durch Destabilisierung im Rahmen der Freisetzung katabol wirkender Enzyme verliert der Knorpel zunehmend seine Widerstandsfähigkeit. Insbesondere durch abnormale mechanische Krafteinwirkungen kommt es zu fortschreitender Erosion und Rissbildung mit Teilung des Knorpels und wie beschrieben konsekutiv zur gesteigerten Zellaktivität sowie zum Remodelling des subchondralen Knochens^[119]. Es ist daher nicht unwahrscheinlich, dass die unterschiedlichen räumlichen Muster, die die Chondrozyten bilden sowie deren Verteilung innerhalb des Gelenkknorpels deren funktionelle Interaktion

mit dem umgebenden Knorpelgewebe und möglicherweise deren aktiven Umstrukturierungsprozess widerspiegeln, den sie während der fortschreitenden OA durchlaufen. Ob und in welchem Ausmaß der Gelenkknorpel jedoch von dieser zellulären Umstrukturierung und der Zunahme der Zelldichte im OA-Knorpel profitiert, muss im Rahmen weiterführender Forschungen evaluiert werden^[1].

4.3 Ausblick

Bereits Zehbe et al. wiesen auf den hohen Stellenwert der 3D-Visualisierung mittels SR- μ CT zur Erforschung geeigneter Knorpelmatrizen für den Einsatz in der gelenkerhaltenden, knorpelregenerativen Therapie hin^[120]. Auch Aicher et Rolauffs heben den möglichen Nutzen des besseren Verständnisses über die zelluläre räumliche Organisation im Gelenkknorpel im Rahmen der Etablierung und Verbesserung knorpelregenerativer Therapien hervor^[5]. Die Kenntnisse über die zellulären Formationen und deren Re-Modelling könnten ebenfalls in Zukunft als Werkzeug zur Verlaufsbeurteilung nach therapeutischer Transplantation beispielsweise mesenchymaler Stammzellen dienen^[5,121,122].

Durch die Erkenntnis, dass ein zelluläres Re-Modelling mit entsprechenden typischen Zellformationen bereits im an eine Knorpelläsion angrenzenden Knorpelbereich mit noch intakter Knorpeloberfläche stattfindet, ist in Zukunft möglicherweise die Diagnose einer beginnenden Knorpeldegeneration noch vor Auftreten der manifesten OA und somit deren Prophylaxe möglich^[47,48]. Diese Diagnostik könnte routinemäßig bei Hochrisikopatienten wie Leistungssportlern oder Berufsgruppen mit entsprechender Gelenkbelastung wie beispielsweise Fliesenleger zum Einsatz kommen. Weiterhin könnten Patienten, die durch ein adäquates Trauma wie zum Beispiel eine intraartikuläre Fraktur ein erhöhtes Arthroserisiko besitzen, mit dieser Diagnostik verlaufskontrolliert werden.^[5,48] Die exakte Umsetzung einer solchen klinischen in-vivo-Diagnostik befindet sich aktuell noch in der Erprobung. Da selbst hochentwickelte 9,4-Tesla-Magnetresonanztomografen (MRT) keine ausreichende zelluläre Auflösung erreichen, wird derzeit an der Entwicklung multiphoton-induzierter Autofluoreszenz-Bildgebung unter

Verwendung eines second-harmonic-generation-Endomikroskops (SHG) gearbeitet, womit bereits vielversprechende Ergebnisse zu erlangen seien^[5].

4.4 Limitationen

Aufgrund des sehr aufwendigen experimentellen Aufbaus wurden abschließend nur drei Knorpelproben in die Auswertung einbezogen. Dies ist im Wesentlichen auf die Verfügbarkeit von Nutzungszeit am SR- μ CT zurückzuführen. Die erhobenen Daten sind jedoch bereits in ihren statistischen Ergebnissen trotz der nur geringen Fallzahl signifikant. Trotzdem ist ein Selektionsbias nicht auszuschließen. Allerdings sind die erhobenen morphologischen Ergebnisse kongruent mit den bisherigen verfügbaren Informationen zu diesem Thema.^[1]

Aufgrund der zur Verfügung stehenden Daten konnte nicht ermittelt werden, über welchen Zeitraum sich die OA in den untersuchten Proben entwickelt hat. Gerade im Hinblick auf die Abweichung der morphologischen Degeneration in Probe #3 wäre es interessant zu wissen, ob die zugrundeliegende Ursache möglicherweise ein fokal-einwirkendes Trauma war und die Entwicklung der Symptomatik möglicherweise sehr schnell fortgeschritten ist, sodass keine großflächige Degeneration erfolgen konnte. Eine weitere Ursache könnte eine in der Vergangenheit durchgeführte Mikrofrakturierung sein, wodurch sich möglicherweise die diffuse Zellanordnung an der Oberfläche der fokalen Läsion erklären ließe. Die Durchführung biochemischer Analysen des Knorpelgewebes sowie Analysen zur zellulären Genexpression, wie sie in den entsprechenden, bereits aufgeführten Studien erfolgt sind, sind zur Einschätzung und Bestätigung der erlangten Erkenntnisse auf Basis der aktuellen Studienlage hilfreich und sollten Gegenstand zukünftiger Forschungen sein.

Im Rahmen der zweidimensionalen, qualitativen Top-Down-Analyse waren deutliche Defizite der Bildschärfe zu erkennen, was dem ungleichmäßigen Probenrelief und der Probendicke zuzurechnen ist. Die manuelle Einstellung der fokalen Bildschärfe durch Setzen der Fokuspunkte in AxioVision stellt ein subjektives Verfahren dar, eine flächendeckende Tiefenkorrektheit ist somit beinahe

ausgeschlossen. Da die zu beobachtenden (S)CSO jedoch ohnehin ein dreidimensionales Gebilde beschreiben, ist eine einheitliche Fokustiefe nicht zwingend notwendig. Die simultane Analyse der (S)CSO aus der Seitansicht validieren die ansonsten lediglich spekulative, dreidimensionale Ausdehnung der beschriebenen (S)CSO. Die mikroskopisch-vergleichende qualitative Analyse der Dünnschnitte vor und nach De-/Rehydratisierung stellte ebenfalls ein rein subjektives Verfahren dar.

Die zweidimensionale quantitative Analyse war zwar möglich, jedoch sind die resultierenden Zellzahlen als relativ zu interpretieren. Absolute Zellzahlen können aufgrund von Überlagerungen der Fluoreszenzsignale dicht aneinander liegender und möglicherweise in unterschiedlichen Tiefen befindlicher Zellen durch das angewandte, subjektive Zählen nicht gewährleistet werden. Für die Bestätigung signifikant unterschiedlicher Zelldichten in den jeweiligen OA-Zonen war dies aber auch nicht notwendig.^[1] Zu erwähnen ist die Subjektivität der Zellzählung an sich durch Untersucher-basierte Definition der Zellstruktur sowie durch manuelles Setzen der Fokuspunkte bei Erstellung der Mosaikaufnahmen.

Im Rahmen der dreidimensionalen qualitativen Analyse gilt es ebenfalls zu betonen, dass jegliche Segmentationen auf Basis subjektiver Definitionen erfolgt sind. Das komplette Verfahren der manuellen Segmentation ist per se subjektiv. Hierunter fällt auch das visuelle Erkennen von Zonengrenzen. Für die automatisierte Segmentation mussten Schwellenwerte definiert werden, die auf subjektiver Einschätzung beruhten. Eine automatisierte Erkennung dieser Muster wäre nur bei weiterer Verbesserung der Aufnahmetechnik umzusetzen. Hier könnte die Phasen-Kontrast SR- μ CT neue Ansätze bieten^[1]. In über den Studienrahmen hinausreichenden Messungen konnte eine Erprobung des Phasenkontrastverfahrens bereits am DESY erfolgen. Die hierbei verwendeten, nicht dehydratisierten Knorpelproben wiesen eine deutlich bessere Differenzierungsmöglichkeit zwischen Zellen und EZM auf, da die EZM viel einheitlicher und rauschfreier zur Darstellung kam. Ein weiterer Vorteil der ausbleibenden Dehydratation ist der Erhalt der originalen Größenverhältnisse des Gewebes, wodurch nicht nur eine bessere Darstellung der Zellen und deren Zellhöfe möglich war, sondern möglicherweise

auch eine bessere Zell-zu-Zell-Diskriminierung möglich ist. Die negativen Einflüsse der Dehydratation auf die Proportionen und Relationen der Gewebestrukturen zueinander wurden bereits in anderen Studien belegt^[61]. Möglicherweise ist der in dieser Studie nur schwach ausgeprägte Vorteil der Propidiumiodid-Färbung gegenüber der Nativproben-Untersuchung ebenfalls auf eine etwaige stark erhöhte Dichte eng aneinander liegender Zellen bzw. Nuclei zurückzuführen. Die Klärung dieser Fragen bedarf weiterführender Forschung.

Ebenfalls vorteilhaft bei ausbleibender Dehydratation wäre die hierdurch ausbleibende Schienung der Proben im Rahmen des Dehydratationsprozesses. In den rekonstruierten 3D-Aufnahmen konnten beispielhaft in Regionen großflächig ausgedehnter OA mit tiefreichenden Fissuren nach apikal hin horizontal verlaufende Zotten festgestellt werden die die Fissuren quasi nach oben abdecken und deren Erscheinungsbild an ein Abknicken und Zusammenquetschen des Gewebes denken lässt. Ob durch diese etwaige Gewebequetschung die Dichterelationen des Knorpels noch weiter beeinflusst werden, ist nicht geklärt und benötigt weiterführender Analysen mittels vergleichender Absorptionskontrast- und Phasenkontrast-Technologie.

Eine quantitative 3D-Analyse ist, basierend auf der Subjektivität der hierfür notwendigen Segmentation ebenfalls ein subjektives, aber theoretisch umsetzbares Verfahren. Die Gründe für das Scheitern der Analyse in dieser Studie können vielseitig sein. Einerseits kann bereits die Graustufenreduktion von 2^{32} auf 2^8 ein Grund sein, weshalb schon bei der Segmentation nicht jede einzelne Zelle erfasst werden konnte, ohne zu viele nicht-zelluläre Strukturen mit einzuschließen. Die erfassten Strukturen waren sehr wahrscheinlich häufig mehrere, dicht aneinander liegende Nuclei, wodurch die stark variierenden Objektgrößen in den jeweiligen Labels erklärbar wären. Auch hier könnte ein Mangel an Graustufen ursächlich dafür sein, dass bereits bei der Segmentation nicht ausschließlich Nuclei, sondern möglicherweise auch weitere Zellbestandteile sowie Zell-Matrix-Komplexe eingeschlossen und binarisiert wurden. Andererseits kann die Auflösung der μ CT trotz einer Voxelgröße von etwa $2,62 * 2,62 * 2,62 \mu\text{m}^3$ zur exakten Zellzählung nicht ausreichend sein. Der Grund hierfür ist, dass möglicherweise

fragmentierte Nuclei, die bei apoptotischen Prozessen entstehen und in der 2D-Zellzählung erfasst worden sein können, durch den Zählalgorithmus nicht differenziert werden können, da bereits die Grenzlinie, die der integrierte Watershed-Algorithmus zwischen zwei als eigenständige Strukturen erkannte Objekte zieht, ein Pixel breit ist. Die hohe Diskrepanz der Resultate verglichen mit jenen der 2D-Zählung ist hierdurch erklärbar. Ob die Verwendung des Phasenkontrastverfahrens durch ausbleibende Dehydratation und resultierend möglicherweise besserer Zelldiskriminierungsmöglichkeit einen Fortschritt zur quantitativen 3D-Analyse beiträgt, bleibt in weiteren Studien zu ergründen.

Offen bleibt die Frage nach der Ätiologie der hellen fleckigen Auflagerungen in Probe #3 sowie singulär in Probe #2. Eine Theorie stellen adhäsive Auflagerungen einer möglicherweise partiell noch vorhandenen Lamina splendens dar, wofür deren ausschließliches Vorkommen apikal in oder auf der intakten Superficialzone spricht. Ein negativer Einfluss auf die qualitative und quantitative Analyse konnte aufgrund derer Lokalisation nicht festgestellt werden.

5 Zusammenfassung

Die manifeste Osteoarthrose stellt ein verbreitetes Krankheitsbild mit hohem subjektiven Leidensdruck sowie einer hohen sozioökonomischen Last dar. Trotzdem sind die zahlreichen Einflussfaktoren auf die Entstehung und Progredienz der OA bislang nur unzureichend geklärt. Als eine Konsequenz der Unwissenheit über die genaue Pathogenese dieser degenerativen Knorpelerkrankung kann die Medizin noch keine adäquaten therapeutischen und prophylaktischen Maßnahmen anbieten, weshalb noch immer in sehr vielen Fällen der künstliche Gelenkersatz, ein irreversibles und potentiell komplikationsträchtiges Verfahren, den letzten Ausweg zur Linderung des oft langjährigen individuellen Leidensdrucks darstellt.

In aktuellen histologischen Studien konnte festgestellt werden, dass sich die zelluläre räumliche Organisation beim Blick auf die Superficialzone des humanen Gelenkknorpels im Rahmen der OA-Entwicklung und -progredienz signifikant verändert. In der hier präsentierten Arbeit konnte erstmalig eine Technik zur μ CT-basierten, dreidimensionalen Darstellung der Chondrozytenorganisation im humanen Kniegelenk-Knorpel etabliert werden. Hiermit war es erstmalig möglich, die räumliche Lokalisation, die räumliche Ausdehnung und die räumlichen Zusammenhänge der Knorpeldegeneration anhand der OA-Stadien-spezifischen (S)CSO im humanen Kniegelenk-Knorpel schichtenübergreifend unter dreidimensionaler Darstellung aller Knorpelschichten nachzuvollziehen. Somit konnten in dieser Studie die bisher zweidimensional beschriebenen Veränderungen sowohl durch histologische Mehrperspektiven-Analysen, als auch durch die μ CT dreidimensional und schichtenübergreifend bestätigt werden. Durch quantitative Analysen konnte die prinzipielle Tauglichkeit dieser Musterdiagnostik zur Früherkennung von Knorpeldegenerationen unterstrichen werden. Dieses Verständnis der räumlichen Chondrozytenorganisation kann künftig bei der Beurteilung der Effektivität regenerativer Therapieansätze des Knorpels von großer Bedeutung sein.

6 Literaturverzeichnis

1. Danalache, M., et al.: **Exploration of changes in spatial chondrocyte organisation in human osteoarthritic cartilage by means of 3D imaging.** *Scientific Reports* 2021, vol. 11 (1), pp. 1-11.
2. Lüllmann-Rauch, R.: **Taschenlehrbuch Histologie.** Georg Thieme Verlag KG 2009, 3. edn.
3. Volarevic, V., et al.: **Human stem cell research and regenerative medicine--present and future.** *Br Med Bull* 2011, vol. 99, pp. 155-68.
4. Stockwell, R. A.: **The interrelationship of cell density and cartilage thickness in mammalian articular cartilage.** *J Anat* 1971, vol. 109 (Pt 3), pp. 411-21.
5. Aicher, W. K., et al.: **The spatial organisation of joint surface chondrocytes: review of its potential roles in tissue functioning, disease and early, preclinical diagnosis of osteoarthritis.** *Annals of the Rheumatic Diseases* 2014, vol. 73 (4), pp. 645-53.
6. Andriacchi, T. P., et al.: **A framework for the in vivo pathomechanics of osteoarthritis at the knee.** *Ann Biomed Eng* 2004, vol. 32 (3), pp. 447-57.
7. Stockwell, R. A.: **Chondrocytes.** *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol)* 1978, vol. 12, pp. 7-13.
8. Goldring, M. B.: **Update on the biology of the chondrocyte and new approaches to treating cartilage diseases.** *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2006, vol. 20 (5), pp. 1003-25.
9. Sophia Fox, A. J., et al.: **The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function.** *Sports Health* 2009, vol. 1 (6), pp. 461-8.
10. Brighton, C. T., et al.: **Zonal analysis of cytoplasmic components of articular cartilage chondrocytes**1984, vol. 27 (11), pp. 1290-9.
11. Mow, V. C., et al.: **Cartilage and diarthrodial joints as paradigms for hierarchical materials and structures.** *Biomaterials* 1992, vol. 13 (2), pp. 67-97.
12. Hunziker, E. B., et al.: **The structural architecture of adult mammalian articular cartilage evolves by a synchronized process of tissue resorption and neoformation during postnatal development**2007, vol. 15 (4), pp. 403-13.
13. Chen, A., et al.: **The Global Economic Cost of Osteoarthritis: How the UK Compares.** *Arthritis* 2012, vol. 2012, pp. 1-6.
14. Puig-Junoy, J., et al.: **Socio-economic costs of osteoarthritis: a systematic review of cost-of-illness studies.** *Semin Arthritis Rheum* 2015, vol. 44 (5), pp. 531-41.
15. Guilak, F., et al.: **Mechanical and biochemical changes in the superficial zone of articular cartilage in canine experimental osteoarthritis.** *J Orthop Res* 1994, vol. 12 (4), pp. 474-84.
16. David-Vaudey, E., et al.: **Fourier Transform Infrared Imaging of focal lesions in human osteoarthritic cartilage.** *Eur Cell Mater* 2005, vol. 10, pp. 51-60.

17. Arokoski, J. P., et al.: **Normal and pathological adaptations of articular cartilage to joint loading.** *Scand J Med Sci Sports* 2000, vol. 10 (4), pp. 186-98.
18. Bellamy, N., et al.: **Intraarticular corticosteroid for treatment of osteoarthritis of the knee.** *Cochrane Database Syst Rev* 2006 (2), p. CD005328.
19. Rolauffs, B., et al.: **Vulnerability of the superficial zone of immature articular cartilage to compressive injury.** *Arthritis & Rheumatism* 2010, vol. 62 (10), pp. 3016-27.
20. Carames, B., et al.: **Mechanical injury suppresses autophagy regulators and pharmacologic activation of autophagy results in chondroprotection.** *Arthritis Rheum* 2012, vol. 64 (4), pp. 1182-92.
21. Kapoor, M., et al.: **Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis.** *Nat Rev Rheumatol* 2011, vol. 7 (1), pp. 33-42.
22. Altman, R., et al.: **Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis: Classification of osteoarthritis of the knee.** *Arthritis & Rheumatism* 1986, vol. 29 (8), pp. 1039-49.
23. Kohn, M. D., et al.: **Classifications in Brief: Kellgren-Lawrence Classification of Osteoarthritis.** *Clinical Orthopaedics and Related Research* 2016, vol. 474 (8), pp. 1886-93.
24. Hong, J. W., et al.: **The prevalence of and demographic factors associated with radiographic knee osteoarthritis in Korean adults aged ≥ 50 years: The 2010–2013 Korea National Health and Nutrition Examination Survey.** *PLOS ONE* 2020, vol. 15 (3), p. e0230613.
25. Lawrence, R. C., et al.: **Estimates of the prevalence of arthritis and selected musculoskeletal disorders in the United States.** *Arthritis & Rheumatism* 1998, vol. 41 (5), pp. 778-99.
26. Zhi, Z., et al.: **The therapeutic effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on osteoarthritis is improved by the activation of the KDM6A/SOX9 signaling pathway caused by exposure to hypoxia.** *J Cell Physiol* 2020.
27. Wright, R. W.: **Osteoarthritis Classification Scales: Interobserver Reliability and Arthroscopic Correlation.** *The Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume* 2014, vol. 96 (14), pp. 1145-51.
28. Lützner, J., et al.: **Surgical options for patients with osteoarthritis of the knee.** *Nature Reviews Rheumatology* 2009, vol. 5 (6), pp. 309-16.
29. O'Reilly, S., et al.: **Lifestyle changes in the management of osteoarthritis.** *Best Practice & Research Clinical Rheumatology* 2001, vol. 15 (4), pp. 559-68.
30. Cancienne, J. M., et al.: **Does Timing of Previous Intra-Articular Steroid Injection Affect the Post-Operative Rate of Infection in Total Knee Arthroplasty?** *J Arthroplasty* 2015, vol. 30 (11), pp. 1879-82.
31. Lungwitz, S., et al.: **Degenerative Cartilage Lesions of the Medial Knee Compartment. Associated Factors, Operative Options, and Preliminary Results from the CartilageRegistry DGOU.** *Zeitschrift für Orthopädie und Unfallchirurgie* 2019, vol. 157 (05), pp. 515-23.

32. Freiling, D., et al.: **Die varisierende Closed-Wedge-Osteotomie am distalen Femur zur Behandlung der unikompartimentalen lateralen Arthrose am Kniegelenk.** *Operative Orthopädie und Traumatologie* 2010, vol. 22 (3), pp. 317-34.
33. Berruto, M., et al.: **Closing-wedge high tibial osteotomy, a reliable procedure for osteoarthritic varus knee.** *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy* 2020.
34. Chabok, H. A.: **Midterm follow-up of closing wedge high tibial osteotomy with upper tibiofibular joint capsulotomy.** *European Journal of Orthopaedic Surgery & Traumatology* 2019, vol. 29 (5), pp. 1153-9.
35. Jordan, K. M.: **EULAR Recommendations 2003: an evidence based approach to the management of knee osteoarthritis: Report of a Task Force of the Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutic Trials (ESCISIT).** *Annals of the Rheumatic Diseases* 2003, vol. 62 (12), pp. 1145-55.
36. Hauer, G., et al.: **Greater activity, better range of motion and higher quality of life following unicompartmental knee arthroplasty: a comparative case–control study.** *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery* 2020, vol. 140 (2), pp. 231-7.
37. Schraknepper, J., et al.: **Influence of patient selection, component positioning and surgeon’s caseload on the outcome of unicompartmental knee arthroplasty.** *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery* 2020.
38. Morris, M. J., et al.: **Mortality and perioperative complications after unicompartmental knee arthroplasty.** *The Knee* 2013, vol. 20 (3), pp. 218-20.
39. Xu, C., et al.: **Is Treatment of Periprosthetic Joint Infection Improving Over Time?** *The Journal of Arthroplasty* 2020.
40. Chalmers, B. P., et al.: **Treatment and Outcome of Periprosthetic Joint Infection in Unicompartmental Knee Arthroplasty.** *The Journal of Arthroplasty* 2020.
41. Enokiya, T., et al.: **Postoperative Anaemia Is a Risk Factor for Bleeding-Related Event in Thromboprophylaxis Using Fondaparinux Sodium Injection after Total Knee or Hip Arthroplasty.** *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 2020, vol. 43 (2), pp. 266-71.
42. Schumacher, B. L., et al.: **Horizontally oriented clusters of multiple chondrons in the superficial zone of ankle, but not knee articular cartilage.** *Anat Rec* 2002, vol. 266 (4), pp. 241-8.
43. Rolauuffs, B., et al.: **Distinct horizontal patterns in the spatial organization of superficial zone chondrocytes of human joints.** *Journal of Structural Biology* 2008, vol. 162 (2), pp. 335-44.
44. Felka, T., et al.: **Loss of spatial organization and destruction of the pericellular matrix in early osteoarthritis in vivo and in a novel in vitro methodology.** *Osteoarthritis and Cartilage* 2016, vol. 24 (7), pp. 1200-9.

45. Gray, H. W., et al.: **Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Medicine & Surgery**. Churchill Livingstone 1995 (New York), 38. edn.
46. Decker, R. S., et al.: **Genesis and morphogenesis of limb synovial joints and articular cartilage**. *Matrix Biol* 2014, vol. 39, pp. 5-10.
47. Rolauffs, B., et al.: **Proliferative remodeling of the spatial organization of human superficial chondrocytes distant from focal early osteoarthritis**. *Arthritis & Rheumatism* 2010, vol. 62 (2), pp. 489-98.
48. Rolauffs, B., et al.: **Onset of preclinical osteoarthritis: the angular spatial organization permits early diagnosis**. *Arthritis & Rheumatism* 2011, vol. 63 (6), pp. 1637-47.
49. Pritzker, K. P. H., et al.: **Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging**. *Osteoarthritis and Cartilage* 2006, vol. 14 (1), pp. 13-29.
50. Müller, B., et al.: **Three-dimensional characterization of cell clusters using synchrotron-radiation-based micro-computed tomography**. *Microscopy and Microanalysis* 2006, vol. 12 (2), pp. 97-105.
51. Beckmann, F., et al.: **High density resolution in synchrotron-radiation-based attenuation-contrast microtomography**. *Proceedings of SPIE* 2008, vol. 7078, p. 70781D.
52. Beckmann, F., et al.: **Microtomography using synchrotron radiation at DESY: current status and future developments**. *SPIE* 2004, vol. 5535.
53. Germann, M., et al.: **Strain fields in histological slices of brain tissue determined by synchrotron radiation-based micro computed tomography**. *J Neurosci Methods* 2008, vol. 170 (1), pp. 149-55.
54. Schurigt, U., et al.: **Cathepsin K deficiency partially inhibits, but does not prevent, bone destruction in human tumor necrosis factor-transgenic mice** 2008, vol. 58 (2), pp. 422-34.
55. Saldamli, B., et al.: **Mikro-Computertomographie für die dreidimensionale Charakterisierung von Implantaten und Geweben**. *SportOrthoTrauma* 2010, vol. 26, pp. 145-51.
56. Engelhardt, M.: **Phasenkontrastbildgebung und Abbildung der Brennfleckintensitätsverteilung** 2008: TU Muenchen).
57. Zehbe, R., et al.: **Going beyond histology. Synchrotron micro-computed tomography as a methodology for biological tissue characterization: from tissue morphology to individual cells**. *Journal of The Royal Society Interface* 2010, vol. 7 (42), pp. 49-59.
58. Coan, P., et al.: **Characterization of osteoarthritic and normal human patella cartilage by computed tomography X-ray phase-contrast imaging: a feasibility study**. *Invest Radiol* 2010, vol. 45 (7), pp. 437-44.
59. Piscaer, T. M., et al.: **In vivo imaging of cartilage degeneration using microCT-arthrography**. *Osteoarthritis and Cartilage* 2008, vol. 16 (9), pp. 1011-7.
60. Siebelt, M., et al.: **Quantifying osteoarthritic cartilage changes accurately using in vivo microCT arthrography in three etiologically distinct rat models**. *Journal of Orthopaedic Research* 2011, vol. 29 (11), pp. 1788-94.

61. Kääb, M., et al.: **Dimensional changes of articular cartilage during immersion-freezing and freeze-substitution for scanning electron microscopy**. *Scanning Microsc* 1998, vol. 12, pp. 465-74.
62. Schindelin, J., et al.: **Fiji: an open-source platform for biological-image analysis**. *Nature Methods* 2012, vol. 9 (7), pp. 676-82.
63. Figure created by Beutler, K. R., by the use of "Top-down (A) and side view (B,C) of cartilage specimen I and the corresponding SR- μ CT image rendering (D)", by Danalache, M., et al., from **Exploration of changes in spatial chondrocyte organisation in human osteoarthritic cartilage by means of 3D imaging**. *Scientific Reports* 2021, Springer Nature (07.05.2021). URL: <https://www.nature.com/articles/s41598-021-89582-w/figures/3>. Copyright © 2021, The Author(s). Licensed by CC BY 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).
64. Newe, A.: **Enriching scientific publications with interactive 3D PDF: An integrated toolbox for creating ready-to-publish figures**. *PeerJ Computer Science* 2016, vol. 2, p. e64.
65. Müller, B., et al.: **Three-dimensional evaluation of biocompatible materials by microtomography using synchrotron radiation**. *Proc SPIE* 2002, vol. 4503, pp. 178-88.
66. Figure created by Beutler, K. R., by the use of "Top-down (A) and side view (B,C) of cartilage specimen II and the corresponding SR- μ CT image rendering (D)", by Danalache, M., et al., from **Exploration of changes in spatial chondrocyte organisation in human osteoarthritic cartilage by means of 3D imaging**. *Scientific Reports* 2021, Springer Nature (07.05.2021). URL: <https://www.nature.com/articles/s41598-021-89582-w/figures/4>. Copyright © 2021, The Author(s). Licensed by CC BY 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).
67. Figure created by Beutler, K. R., by the use of "Top-down (A) and side view (B,C) of cartilage specimen III and the corresponding μ CT image rendering (D)", by Danalache, M., et al., from **Exploration of changes in spatial chondrocyte organisation in human osteoarthritic cartilage by means of 3D imaging**. *Scientific Reports* 2021, Springer Nature (07.05.2021). URL: <https://www.nature.com/articles/s41598-021-89582-w/figures/5>. Copyright © 2021, The Author(s). Licensed by CC BY 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).
68. Figure created by Beutler, K. R., by the use of "Pattern specific chondrocyte density", by Danalache, M., et al., from **Exploration of changes in spatial chondrocyte organisation in human osteoarthritic cartilage by means of 3D imaging**. *Scientific Reports* 2021, Springer Nature (07.05.2021). URL: https://static-content.springer.com/esm/art%3A10.1038%2Fs41598-021-89582-w/MediaObjects/41598_2021_89582_MOESM1_ESM.pdf. Copyright © 2021, The Author(s). Licensed by CC BY 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).
69. Figure created by Beutler, K. R., by the use of "Cellular density in healthy (A) and osteoarthritic (B) cartilage as a function of cellular organisation", by Danalache, M., et al., from **Exploration of changes in spatial chondrocyte organisation in human osteoarthritic cartilage by**

- means of 3D imaging.** *Scientific Reports* 2021, Springer Nature (07.05.2021). URL: <https://www.nature.com/articles/s41598-021-89582-w/figures/6>. Copyright © 2021, The Author(s). Licensed by CC BY 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).
70. Table created by Beutler, K. R., by the use of "*Comparison of cellular density as a function of cellular organisation by using the false-discovery rate (FDR) for alpha adjustment*", by Danalache, M., et al., from **Exploration of changes in spatial chondrocyte organisation in human osteoarthritic cartilage by means of 3D imaging.** *Scientific Reports* 2021, Springer Nature (07.05.2021). URL: https://static-content.springer.com/esm/art%3A10.1038%2Fs41598-021-89582-w/MediaObjects/41598_2021_89582_MOESM1_ESM.pdf. Copyright © 2021, The Author(s). Licensed by CC BY 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).
71. Original title: "*Sagittal (A) and axial (B) renderings of the cartilage sample I from figure 4*", by Danalache, M., et al., from **Exploration of changes in spatial chondrocyte organisation in human osteoarthritic cartilage by means of 3D imaging.** *Scientific Reports* 2021, Springer Nature (07.05.2021). URL: https://static-content.springer.com/esm/art%3A10.1038%2Fs41598-021-89582-w/MediaObjects/41598_2021_89582_MOESM1_ESM.pdf. Copyright © 2021, The Author(s). Licensed by CC BY 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).
72. Original title: "*Identification of individual patterns in a cartilage data set*", by Danalache, M., et al., from **Exploration of changes in spatial chondrocyte organisation in human osteoarthritic cartilage by means of 3D imaging.** *Scientific Reports* 2021, Springer Nature (07.05.2021). URL: https://static-content.springer.com/esm/art%3A10.1038%2Fs41598-021-89582-w/MediaObjects/41598_2021_89582_MOESM1_ESM.pdf. Copyright © 2021, The Author(s). Licensed by CC BY 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).
73. Figure created by Beutler, K. R., by the use of "*Sagittal (A) and axial (B) renderings of the cartilage sample I from figure 4*", by Danalache, M., et al., from **Exploration of changes in spatial chondrocyte organisation in human osteoarthritic cartilage by means of 3D imaging.** *Scientific Reports* 2021, Springer Nature (07.05.2021). URL: https://static-content.springer.com/esm/art%3A10.1038%2Fs41598-021-89582-w/MediaObjects/41598_2021_89582_MOESM1_ESM.pdf. Copyright © 2021, The Author(s). Licensed by CC BY 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).
74. Original title: "*Spatial chondrocyte patterns imaged by μ CT*", by Danalache, M., et al., from **Exploration of changes in spatial chondrocyte organisation in human osteoarthritic cartilage by means of 3D imaging.** *Scientific Reports* 2021, Springer Nature (07.05.2021). URL: <https://www.nature.com/articles/s41598-021-89582-w/figures/1>. Copyright © 2021, The Author(s). Licensed by CC BY 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

75. Figure created by Beutler, K. R., by the use of "Segmented slices of cartilage of chondrocytes and extracellular matrix (A-D) and of the isolated chondrocytes (A'-D')", by Danalache, M., et al., from **Exploration of changes in spatial chondrocyte organisation in human osteoarthritic cartilage by means of 3D imaging**. *Scientific Reports* 2021, Springer Nature (07.05.2021). URL: https://static-content.springer.com/esm/art%3A10.1038%2Fs41598-021-89582-w/MediaObjects/41598_2021_89582_MOESM1_ESM.pdf. Copyright © 2021, The Author(s). Licensed by CC BY 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).
76. Bos, P. K., et al.: **Cellular origin of neocartilage formed at wound edges of articular cartilage in a tissue culture experiment**. *Osteoarthritis Cartilage* 2008, vol. 16 (2), pp. 204-11.
77. Lotz, M. K., et al.: **Cartilage cell clusters**. *Arthritis & Rheumatism* 2010, vol. 62 (8), pp. 2206-18.
78. Mankin, H. J., et al.: **Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips**. *The Journal of bone and joint surgery American volume* 1970, vol. 52 (3), pp. 424-34.
79. van der Kraan, P. M., et al.: **Chondrocyte hypertrophy and osteoarthritis: role in initiation and progression of cartilage degeneration?** *Osteoarthritis Cartilage* 2012, vol. 20 (3), pp. 223-32.
80. Mankin, H. J., et al.: **Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data**. *The Journal of bone and joint surgery American volume* 1971, vol. 53 (3), pp. 523-37.
81. Chi, S. S., et al.: **Communication between paired chondrocytes in the superficial zone of articular cartilage**. *J Anat* 2004, vol. 205 (5), pp. 363-70.
82. Bruehlmann, S. B., et al.: **Regional variations in the cellular matrix of the annulus fibrosus of the intervertebral disc**. *J Anat* 2002, vol. 201 (2), pp. 159-71.
83. Lo, I. K., et al.: **The cellular matrix: a feature of tensile bearing dense soft connective tissues**. *Histology and histopathology* 2002, vol. 17 (2), pp. 523-37.
84. Lo, I. K. Y., et al.: **The cellular networks of normal ovine medial collateral and anterior cruciate ligaments are not accurately recapitulated in scar tissue**. *Journal of anatomy* 2002, vol. 200 (Pt 3), pp. 283-96.
85. Hellio Le Graverand, M.-P., et al.: **Formation and phenotype of cell clusters in osteoarthritic meniscus**. *Arthritis & Rheumatism* 2001, vol. 44 (8), pp. 1808-18.
86. Hellio Le Graverand, M. P., et al.: **Early changes in lapine menisci during osteoarthritis development: Part I: cellular and matrix alterations**. *Osteoarthritis Cartilage* 2001, vol. 9 (1), pp. 56-64.
87. Hashimoto, S., et al.: **Nitric oxide production and apoptosis in cells of the meniscus during experimental osteoarthritis**. *Arthritis & Rheumatism* 1999, vol. 42 (10), pp. 2123-31.

88. Heraud, F., et al.: **Apoptosis in normal and osteoarthritic human articular cartilage.** *Annals of the rheumatic diseases* 2000, vol. 59 (12), pp. 959-65.
89. Blanco, F. J., et al.: **Osteoarthritis chondrocytes die by apoptosis. A possible pathway for osteoarthritis pathology.** *Arthritis Rheum* 1998, vol. 41 (2), pp. 284-9.
90. Aigner, T., et al.: **Apoptotic cell death is not a widespread phenomenon in normal aging and osteoarthritis human articular knee cartilage: a study of proliferation, programmed cell death (apoptosis), and viability of chondrocytes in normal and osteoarthritic human knee cartilage.** *Arthritis Rheum* 2001, vol. 44 (6), pp. 1304-12.
91. Hashimoto, S., et al.: **Chondrocyte apoptosis and nitric oxide production during experimentally induced osteoarthritis.** *Arthritis Rheum* 1998, vol. 41 (7), pp. 1266-74.
92. Pfander, D., et al.: **Expression of Early and Late Differentiation Markers (Proliferating Cell Nuclear Antigen, Syndecan-3, Annexin VI, and Alkaline Phosphatase) by Human Osteoarthritic Chondrocytes** 2001, vol. 159 (5), pp. 1777-83.
93. Lingaraj, K., et al.: **Vascular endothelial growth factor (VEGF) is expressed during articular cartilage growth and re-expressed in osteoarthritis.** *Annals of the Academy of Medicine, Singapore* 2010, vol. 39 (5), pp. 399-403.
94. Khan, I. M., et al.: **Fibroblast growth factor-2 induced chondrocyte cluster formation in experimentally wounded articular cartilage is blocked by soluble Jagged-1.** *Osteoarthritis Cartilage* 2010, vol. 18 (2), pp. 208-19.
95. Nakase, T., et al.: **Localization of bone morphogenetic protein-2 in human osteoarthritic cartilage and osteophyte.** *Osteoarthritis Cartilage* 2003, vol. 11 (4), pp. 278-84.
96. Omoto, S., et al.: **Expression and localization of connective tissue growth factor (CTGF/Hcs24/CCN2) in osteoarthritic cartilage.** *Osteoarthritis Cartilage* 2004, vol. 12 (10), pp. 771-8.
97. Kielty, C. M., et al.: **Type X collagen, a product of hypertrophic chondrocytes.** *The Biochemical journal* 1985, vol. 227 (2), pp. 545-54.
98. Gerstenfeld, L. C., et al.: **Expression of bone-specific genes by hypertrophic chondrocytes: implication of the complex functions of the hypertrophic chondrocyte during endochondral bone development.** *Journal of cellular biochemistry* 1996, vol. 62 (1), pp. 1-9.
99. Kouri, J. B., et al.: **Ultrastructural study of chondrocytes from fibrillated and non-fibrillated human osteoarthritic cartilage.** *Osteoarthritis Cartilage* 1996, vol. 4 (2), pp. 111-25.
100. Chang, C., et al.: **Motile chondrocytes from newborn calf: migration properties and synthesis of collagen II.** *Osteoarthritis Cartilage* 2003, vol. 11 (8), pp. 603-12.
101. Maniwa, S., et al.: **Effects of hyaluronic acid and basic fibroblast growth factor on motility of chondrocytes and synovial cells in culture.** *Acta orthopaedica Scandinavica* 2001, vol. 72 (3), pp. 299-303.

102. Takebayashi, T., et al.: **Hepatocyte growth factor/scatter factor modulates cell motility, proliferation, and proteoglycan synthesis of chondrocytes.** *The Journal of cell biology* 1995, vol. 129 (5), pp. 1411-9.
103. Fujita, T., et al.: **Runx2 induces osteoblast and chondrocyte differentiation and enhances their migration by coupling with PI3K-Akt signaling.** *The Journal of cell biology* 2004, vol. 166 (1), pp. 85-95.
104. Meachim, G., et al.: **Cell Counts of Normal and Osteo-Arthritic Articular Cartilage in Relation to the Uptake of Sulphate (35SO4) in vitro.** *Annals of the Rheumatic Diseases* 1962, vol. 21 (1), pp. 45-50.
105. Miles, J. S., et al.: **BIOCHEMICAL STUDIES OF HUMAN CARTILAGE DURING THE AGING PROCESS.** *Journal of the American Geriatrics Society* 1964, vol. 12, pp. 1-20.
106. Stockwell, R. A.: **The cell density of human articular and costal cartilage.** *J Anat* 1967, vol. 101 (Pt 4), pp. 753-63.
107. Huch, K.: **Knee and ankle: human joints with different susceptibility to osteoarthritis reveal different cartilage cellularity and matrix synthesis in vitro.** *Archives of orthopaedic and trauma surgery* 2001, vol. 121 (6), pp. 301-6.
108. Eggli, P. S., et al.: **Quantitation of structural features characterizing weight- and less-weight-bearing regions in articular cartilage: a stereological analysis of medial femoral condyles in young adult rabbits.** *Anat Rec* 1988, vol. 222 (3), pp. 217-27.
109. Armstrong, S. J., et al.: **Topographical variation within the articular cartilage and subchondral bone of the normal ovine knee joint: a histological approach.** *Osteoarthritis Cartilage* 1995, vol. 3 (1), pp. 25-33.
110. Gilmore, R. S., et al.: **Chondrocyte distribution in the articular cartilage of human femoral condyles.** *Journal of anatomy* 1988, vol. 157, pp. 23-31.
111. Hunziker, E. B., et al.: **Quantitative structural organization of normal adult human articular cartilage.** *Osteoarthritis and Cartilage* 2002, vol. 10 (7), pp. 564-72.
112. Tetlow, L. C., et al.: **Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine production by chondrocytes of human osteoarthritic cartilage: associations with degenerative changes.** *Arthritis Rheum* 2001, vol. 44 (3), pp. 585-94.
113. von der Mark, K., et al.: **Type X collagen synthesis in human osteoarthritic cartilage. Indication of chondrocyte hypertrophy.** *Arthritis Rheum* 1992, vol. 35 (7), pp. 806-11.
114. Wang, X., et al.: **Regulation of MMP-13 expression by RUNX2 and FGF2 in osteoarthritic cartilage.** *Osteoarthritis Cartilage* 2004, vol. 12 (12), pp. 963-73.
115. Pullig, O., et al.: **Chondrocyte differentiation in human osteoarthritis: expression of osteocalcin in normal and osteoarthritic cartilage and bone.** *Calcified tissue international* 2000, vol. 67 (3), pp. 230-40.
116. Boehme, K. A., et al.: **Onset and Progression of Human Osteoarthritis—Can Growth Factors, Inflammatory Cytokines, or Differential miRNA Expression Concomitantly Induce Proliferation,**

- ECM Degradation, and Inflammation in Articular Cartilage?**
International Journal of Molecular Sciences 2018, vol. 19 (8), p. 2282.
117. Poole, C. A., et al.: **Chondrons from articular cartilage. III. Morphologic changes in the cellular microenvironment of chondrons isolated from osteoarthritic cartilage.** *Arthritis Rheum* 1991, vol. 34 (1), pp. 22-35.
 118. Goldring, M. B., et al.: **Inflammation in osteoarthritis.** *Current opinion in rheumatology* 2011, vol. 23 (5), pp. 471-8.
 119. Radin, E. L., et al.: **Effects of mechanical loading on the tissues of the rabbit knee.** *J Orthop Res* 1984, vol. 2 (3), pp. 221-34.
 120. Zehbe, R., et al.: **Three-dimensional visualization of in vitro cultivated chondrocytes inside porous gelatine scaffolds: A tomographic approach.** *Acta Biomaterialia* 2010, vol. 6, pp. 2097-107.
 121. Pilz, G. A., et al.: **Human term placenta-derived mesenchymal stromal cells are less prone to osteogenic differentiation than bone marrow-derived mesenchymal stromal cells.** *Stem cells and development* 2011, vol. 20 (4), pp. 635-46.
 122. Aicher, W. K., et al.: **Regeneration of cartilage and bone by defined subsets of mesenchymal stromal cells--potential and pitfalls.** *Advanced drug delivery reviews* 2011, vol. 63 (4-5), pp. 342-51.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Basierend auf dem von Herrn Prof. Dr. med. Bernd Rolauffs beschriebenen Modell zur räumlichen Organisation der Chondrozyten im degenerierten Knorpel erfolgte die Konzeption der Studie durch Herrn Prof. Dr. med. Ulf Krister Hofmann, Leitender Oberarzt des Universitätsklinikums für Orthopädie in Tübingen.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Herrn Prof. Dr. med. Ulf Krister Hofmann von mir eigenständig durchgeführt. Die Durchführung der μ CT-Messungen am DESY in Hamburg erfolgte unter Supervision durch Frau Dr. Imke Greving durch mich. Die Aufarbeitung und Segmentierung der μ CT-Aufnahmen am Institute of Evolution and Ecology in Tübingen erfolgte nach Einarbeitung durch Herrn Dr. Stefan Fischer durch mich.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung durch Herrn Prof. Dr. med. Ulf Krister Hofmann durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben. Sämtliche Abbildungen sind in Eigenarbeit entwickelt worden und unterliegen dem Urheberrecht des Autors.

Bestandteile dieser Arbeit werden entsprechend der jeweiligen Zitate dieses Manuskripts in einer zu einem wesentlichen Teil aus dieser Arbeit hervorgehenden Veröffentlichung verwendet. Für die in dieser Veröffentlichung ergänzend durchgeführten Versuche, die ergänzend erzielten Resultate, die ergänzend erstellten Abbildungen und Tabellen sowie für die ergänzenden Textpassagen gilt die weiterführende Erklärung zum Mitwirken der entsprechenden Co-Autoren an der Veröffentlichung: Frau Marina Danalache half bei der Interpretation der Daten und schrieb das Manuskript. Herr Kevin Ralf Beutler führte die Versuche, die Datenerhebung, die Datenverarbeitung und die Erstellung der Abbildungen durch und schrieb ebenfalls das Manuskript. Frau Dr. Imke Greving leitete die μ CT-Messungen und half beim Schreiben des Manuskripts. Herr Dr. Stefan Fischer half bei der Aufarbeitung und Segmentierung der μ CT-Daten und beim Verfassen des Manuskripts. Herr Julius Wolfgart half bei den Versuchen und bei der

Erstellung des Manuskripts. Herr Florian Bonnaire half bei den μ CT-Versuchen sowie bei den statistischen Analysen. Herr Prof. Dr. med. Bernd Rolauffs beaufsichtigte die Studie und schrieb ebenfalls das Manuskript. Herr Prof. Dr. med. Ulf Krister Hofmann stellte das Studiendesign auf, leitete die Versuche und schrieb ebenfalls das Manuskript.

8 Veröffentlichungen

Zu wesentlichen Anteilen aus dieser Arbeit ist eine Veröffentlichung hervorgegangen, die im Zeitraum der Begutachtung der Arbeit im Journal „**Scientific Reports**“ des **Nature Portfolios** publiziert wurde. In dieser Veröffentlichung bin ich korrespondierender sowie geteilter Erstautor:

1. Danalache, M., et al.: **Exploration of changes in spatial chondrocyte organisation in human osteoarthritic cartilage by means of 3D imaging**. *Scientific Reports* 2021, vol. 11 (1).

9 Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Ulf Krister Hofmann, der mir als Doktorvater die Durchführung der Studie ermöglicht hat, mich in die Studie eingearbeitet hat, mich während der Studiendurchführung stets begleitet und mich bei der Promotion unterstützt hat.

Besonders danken möchte ich Herrn Dr. Stefan Fischer für die große Unterstützung bei der Analyse und Bearbeitung der dreidimensionalen Aufnahmen am Institute of Evolution and Ecology in Tübingen.